

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**DEPARTAMENT DE QUÍMICA**



**Sensores electroquímicos tipo lengua electrónica  
voltamétrica aplicados al control medioambiental y a  
la industria alimentaria**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:  
**Inmaculada Campos Sánchez**

Dirigida por:  
**Dr. Juan Soto Camino**  
**Dr. Luis Gil Sánchez**

**Valencia, Mayo 2013**





Dr. JUAN SOTO CAMINO, Catedrático de Escuela de la Universidad Politécnica de Valencia.

Dra. LUIS GIL SÁNCHEZ, Profesor Titular de la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta doña Inmaculada Campos Sánchez en esta memoria, bajo el título *"Sensores electroquímicos tipo lengua electrónica voltamétrica aplicados al control medioambiental y a la industria alimentaria"* ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al grado de Doctor, expedimos la presente que firmamos en Valencia, a 3 de mayo de 2013.

Dr. Juan Soto Camino

Dr. Luis Gil Sánchez



*A mis padres*



***Agradecimientos.***

Escribir y defender una tesis. Suena raro y lejano cuando empiezas, pero el tiempo pasa rápido y llega el momento de acabar otra etapa más en tu vida. Una etapa en la que aprendes muchas cosas, no solo científicas. Aprendes a convivir, a tener que ir en único sentido en laboratorio siguiendo las rotondas para no chocarte con nadie, a compartir y a ser un grupo. Por todo ello quisiera darle las gracias a todo el mundo que me ha ayudado durante esta etapa de mi vida.

En primer lugar a me gustaría agradecerles a mis directores de tesis Juan Soto Camino y Luis Gil Sánchez, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, pero sobre todo, Juan me gustaría agradecerle la confianza que has depositado en mí, especialmente en esta última etapa de mi tesis.

Gracias a Ramón, a Felix, a Loles, a JV y a Luis por ayudarme en los momentos de dificultades. A Miguel y a Rafa por su ayuda con esa caja negra llamada estadística.

Gracias al grupo del Profesor Marco Mascini por permitirme realizar mi estancia en su laboratorio. Ilaria, Francesca, Simona, Diego y Fabiana, gracias por la ayuda que me prestasteis durante mi estancia en Florencia.

Pero sobre todo me gustaría agradecer al 2.6 y todas sus exiliados los buenos momentos vividos juntos. Gracias a Carmen por divagar conmigo, a Elena por poner orden en momentos de caos. Andrea, churri, echo de menos perseguirte. A vosotras y a Tati, Santi, Estela y Sanfeliu por vuestra acogida, cambiando el UV de sitio para dejarme un hueco (ahí empezaron los problemas de espacio). Hano, hemos compartido muchos momentos muy divertidos, gracias por todos ellos y por enseñarme a que en esta vida no hay que estresarse.

A Inma y a Yoli compañeras desde el principio. Inma pero eres campos o candel. Yoli gracias por tu risas, nunca olvidaré nuestro viaje a Copenhague. Mary, mi compañera de gym, sin ti no hubiera madrugado para hacer deporte. Edgar, mi

casi vecino, gracias por ser tan cariñoso. Ale, compi de fiestas de pijama. Laura, Nuria, Cris G., Sameh, Luis Enrique, Marian, Patri, Carol, Mar y LLuis, gracias por los momentos divertidos que hemos compartido. A los frikis de la Dremmel y mis compis ahora en diseño, Román y Jose Manuel, gracias las risas compartidas y por las conversaciones de besugo que tanto nos gustan, pero sobre todo gracias porque desde que llegasteis he olvidado lo que es una herramienta. A la nueva, mi vecina y compi de bici, Cris T., gracias por enseñarme que si quieres puedes.

A mis compañeros de los laboratorios 2.2, 2.5, del laboratorio de microelectrónica hibrida y a los habitantes de burja, por los ratos de café, risas y sofá.

Y aunque no directamente en la tesis, pero si en muchos otros momentos, gracias a las Perras. A las químicas: Julia, Ana, Eva, Concha y Encarna, gracias porque desde que empezamos juntas estudiando en la biblio, en el lab y en muchos otros momentos, habéis sido un gran apoyo. Gracias por vuestra comprensión, por vuestros consejos. Julia y Concha ánimo, que ya lo tenéis ahí. Ana, mucha suerte en tu nueva etapa. A vosotras y Mari, Isa, y Alba, gracias por las risas y por todas las cervezas que nos hemos tomado y que nos tomaremos juntas. No me puedo olvidar de ti, mi compi de lab desde el primer día, las más tardonas, las más patosas, Sandra. Sabes que te queremos y que te echamos de menos.

Esta tesis no sería lo mismo sin mi amigo de comer los martes, que a su vez en mi chofer y amigo. Vicente, gracias por todos los momentos en que me escuchaste, aun sin enterarte de nada, por aguantar mientras que renegaba y por conseguir siempre que sonría.

Gracias Víctor, por aguantarme, cuidarme, animarme, por creer en mí, pero sobre todo gracias por quererme por muy difícil que eso sea en algunos momentos.

Si hay alguien importante a quien darle las gracias es a mis padres. Gracias por enseñarme que si quieres ser alguien en la vida te lo tienes que con esfuerzo todo se puede conseguir. Por apoyarme, por estar siempre ahí cuando os he necesitado



y por darlo todo por mí y por mis hermanas. Gracias a mis hermanas, Mari y Laura, y también a Ana, por escucharme y por estar ahí en los malos momentos. Por formar una gran familia y por demostrarme siempre lo mucho que me queréis.



## Resumen

En la presente tesis doctoral se exponen los resultados obtenidos en el desarrollo de las lenguas electrónicas para diferentes aplicaciones en el ámbito del medio ambiente y de la industria alimentaria. La lengua electrónica presentada en esta tesis, está basada en la voltametría de pulsos y emplea electrodos metálicos como sensores. Dicha lengua electrónica incluye entre sus sensores, dos conjuntos de metales con reactividades totalmente diferentes como son por un lado los metales nobles, Pt, Rh, Ir y Au, los cuales son difíciles de oxidar y un conjunto de metales más reactivos como son Co, Cu, Ag y Ni. Estos metales reaccionan con muchos compuestos cambiando su comportamiento electroquímico. Además, en esta tesis también se ha demostrado la importancia que el diseño del de pulsos a aplicar y la duración de la misma tiene en los resultados finales.

En el campo del medioambiente, la lengua electrónica ha sido aplicada para la determinación de simulantes de agentes de guerra química o simulantes de agentes nerviosos en agua. En este trabajo se demostró que la lengua electrónica diseñada es capaz de diferenciar entre los simulantes de agentes nerviosos: DCP y DCNP de un conjunto de interferentes, con estructura química de organofosforados. Estudios de PLS han demostrado que la lengua electrónica posee una buena capacidad para cuantificar mezclas de ambos simulantes en presencia de un tercer interferente (OP-2).

En la segunda aplicación en este campo, se desarrolló una lengua electrónica aplicada al control de la calidad de las aguas residuales. En este caso, los parámetros más importantes que normalmente se encuentran como contaminantes en las aguas residuales, como la demanda química de oxígeno soluble (DQO), demanda biológica de oxígeno soluble (DBO), nitrógeno amoniacal

( $\text{NH}_4\text{-N}$ ), ortofosfato ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4\text{-S}$ ) fueron determinados con resultados satisfactorios.

Por último, en el campo de la industria alimentaria se han desarrollado dos aplicaciones distintas. La primera de ella ha sido la determinación simultánea de agentes de curado de carne como son el cloruro, el nitrato y el nitrito en nuestras de carne picada. La segunda aplicación en este campo, ha sido el desarrollo de una lengua electrónica capaz de seguir el proceso de maduración de 7 de las más comunes variedades de uvas (Macabeo, Chardonnay, Pinot Noir, Sauvignon Caberné, Shyrah, Merlot y Bobal), y además, controlar el proceso de fermentación de una variedad en concreto, la uva Macabeo.

## Resum

En la present tesi doctoral s'exposen els resultats obtinguts en el desenvolupament de llengües electròniques per diferents aplicacions en l'àmbit del medi ambient i de la indústria alimentària. La llengua electrònica presentada en aquesta tesi està basada en la voltametria de polsos i utilitza elèctrodes metàl·lics com a sensors. Aquesta llengua electrònica inclou entre els seus sensors, dos conjunts de metalls amb reactivitats totalment diferents com són per una banda els metalls nobles: Pt, Rh, Ir i Au, els quals són difícils d'oxidar i per conjunt de metalls més reactius com són Co, Cu, Ag i Ni. Aquests metalls reaccionen amb diversos compostos canviant el seu comportament electroquímic. A més, en aquesta tesi també s'han demostrat la importància que el disseny del conjunt de polsos a aplicar i la seva durada té en els resultats finals.

En el camp del medi ambient, la llengua electrònica ha estat aplicada per a la determinació de simulants d'agents de guerra química o agents nerviosos en aigua. En aquest treball es va demostrar que la llengua electrònica dissenyada és capaç de diferenciar entre els simulants d'agents nerviosos: DCP i DCNP d'un conjunt de interferents, amb estructura química de organofosforats. Estudis de PLS han demostrat que la llengua electrònica té una bona capacitat per quantificar ambdós simulants a l'hora i en presència d'un tercer interferent (OP-2).

En una segona aplicació en aquest camp, es va desenvolupar una llengua electrònica aplicada al control de la qualitat d'aigües residuals. En aquest cas, els paràmetres més importants que normalment es troben com a contaminants en les aigües residuals, com la demanda química d'oxigen soluble (DQO), demanda biològica d'oxigen soluble (DBO), nitrogen amoniacal ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ), ortofosfat ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) i sulfat ( $\text{SO}_4\text{-S}$ ) van ser determinats amb resultats satisfactoris.

Finalment, en el camp de la indústria alimentària s'han desenvolupat dues aplicacions diferents. La primera d'ella ha estat la determinació simultània d'agents de curat de carn com són el clorur, el nitrat i el nitrit en mostres de carn picada. La segona aplicació en aquest camp, ha estat el desenvolupament d'una llengua electrònica capaç de seguir el procés de maduració de 7 de les més comuns varietats de raïm (Macabeu, Chardonnay, Pinot Noir, Caberné Sauvignon, Shyrah, Merlot i Bobal), a més, controlar el procés de fermentació d'una varietat en concret, el raïm Macabeu.

**Abstract**

In this thesis, the results obtained in the development of electronic tongues for different applications in the field of environment and food industry are exposed. The electronic tongue presented in this thesis is based on pulse voltammetry and employs metal electrodes as sensors. This electronic tongue includes among its sensors, two sets of sensors with very different reactivity such as noble metals Pt, Rh, Ir and Au, which are metals with difficulty to be oxidized and a set of more reactive metals such as Co, Cu, Ag and Ni. These metals react with many compounds modifying its electrochemical behavior. In addition, this thesis also shows the importance of designing the pulse array to be applied and its duration in the final results.

In the environmental field, the electronic tongue has been applied to the determination of chemical warfare agent mimics or nerve agent mimics in water solutions. This study showed that the electronic tongue can differentiate between the warfare agents mimics: DCNP DCP and a set of interfering with organophosphate chemical structure. PLS studies have shown that electronic tongue has a good capability of quantifying both nerve agent mimic mixtures in the presence of a third interference (OP-2).

In the second application in this field, we developed an electronic tongue applied to control the quality of wastewater. In this case, the most important parameters normally found as contaminants in wastewater, like soluble chemical oxygen demand (COD), soluble biological oxygen demand (BOD), ammonia nitrogen ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ), orthophosphate ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) and sulfate ( $\text{SO}_4\text{-S}$ ) were determined with satisfactory results.

Finally, in the field of food industry, we have developed two different applications. The first one has been the simultaneous determination of meat curing agents such as chloride, nitrate and nitrite in minced meat. The second

application in this field has been the development of an electronic tongue which can follow the ripeness process of 7 of the most common varieties of grapes (Macabeo, Chardonnay, Pinot Noir, Sauvignon Caberne, Shyrah, Merlot and Bobal), and moreover, it is capable to control the fermentation process of one of these varieties of grapes, specifically Macabeo grapes.



Los resultados de esta tesis y las colaboraciones realizadas han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

1. I. Campos, L. Gil, R. Martínez-Máñez, J. Soto, J.L. Vivancos. Use of a voltammetric electronic tongue for predicting levels of nerve agent mimics. *Procedia Chemistry* (2009) 1, 325.
2. I. Campos, L. Gil, R. Martínez-Máñez, J. Soto, J.L. Vivancos. Use of a voltammetric electronic tongue for detection and classification of nerve agent mimics. *Electroanal.* (2010) 22, 1643.
3. I. Campos, R. Masot, M. Alcañiz, L. Gil, J. Soto, J. L. Vivancos, E. García-Breijo, R. H. Labrador, J. M. Barat, R. Martínez-Máñez. Accurate concentration determination of anions nitrate, nitrite and chloride in minced meat using a voltammetric electronic tongue. *Sens. Actuators B: Chem.* (2010) 149, 71.
4. M. Marrakchi, I. Campos, S. Helali, N. Mejri, J. Soto, M. A. González-Martínez, M. Hamdi, A. Abdelghani. A label-free interdigitated microelectrodes immunosensor for pesticide detection. *Sensor Letters* (2011) 9, 1.
5. I. Campos, M. Alcañiz, R. Masot, J. Soto, R. Martínez-Máñez, J.L. Vivancos, L. Gil. A method of pulse array design for voltammetric electronic tongues. *Sens. Actuators B: Chem* (2012) 161, 556.

6. I. Campos, M. Alcañiz, D. Aguado, R. Barat, J. Ferrer, L. Gil, M. Marrakchi, R. Martínez-Mañez, J. Soto, J.L. Vivancos. A voltammetric electronic tongue as tool for water quality monitoring in wastewater treatment plants. *Water Research* (2012) 46, 2605.
7. R. Bataller, I. Campos, M. Alcañiz, L. Gil, R. Martínez-Mañez, J. Soto, J.L. Vivancos. A novel humid electronic nose based on voltammetry. *Procedia Engineering*, (2012) 47, 941.
8. R. Bataller, I. Campos, N. Laguarda-Miro, M. Alcañiz, J. Soto, R. Martínez-Mañez, L. Gil, E. García-Breijo, J. Ibáñez-Civera. Glyphosate detection by means of a voltammetric electronic tongue and discrimination of potential interferents. *Sensors* (2012) 12, 17553.
9. F. Bettazzi, L. Enayati, I. Campos, R. Motaghed, M. Mascini, I. Palchetti. Electrochemical bioassay for the detection of TNF- $\alpha$  using magnetic beads and disposable screen-printed array of electrodes. *Bioanalysis* (2013) 5, 11.
10. I. Campos, R. Bataller, R. Armero, J.M. Gandía, J. Soto, R. Martinez-Mañez, L. Gil-Sánchez. Monitoring grapes ripeness using voltammetric electronic tongue. Submitted.

**Abreviaturas**

<b>HEPES</b>	Ácido N-[2-hidroxietil] piperacín-N'-[2-etanosulfónico]
<b>DCP</b>	Dietil clorofosfato
<b>DCNP</b>	Dietil cianofosfato
<b>OP-1</b>	Dietil (1-feniletil) fosfonato
<b>OP-2</b>	Dietil (metiltiometil) fosfonato
<b>OP-3</b>	Dietil (2-cianoetil) fosfonato
<b>OP-4</b>	Dietil metil fosfonato
<b>OP-5</b>	Trietil fosfonato
<b>OP-6</b>	Dietil-(2-oxopropil) fosfonato
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>DBO</b>	Demanda biológica de oxígeno
<b>Fe(Cp)<sub>2</sub></b>	Ferroceno
<b>TCNQ</b>	7,7,8,8-Tetracianoquinodimetano
<b>[Ru(bipy)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub></b>	Cloruro de tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II)
<b>MAC</b>	Macabeo
<b>CH</b>	Chardonnay
<b>PN</b>	Pinot Noir
<b>SY</b>	Sirah
<b>MR</b>	Merlot
<b>CS</b>	Cabernet Sauvignon
<b>BOB</b>	Bobal



## Índice

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. CONCEPTO LENGUA ELECTRÓNICA .....	3
1.1. <i>Sistema del gusto biológico.</i> .....	3
1.1.1. El sentido del gusto .....	4
1.2. <i>Definición de lengua electrónica.</i> .....	6
1.2.1. Analogía sistema gustativo humano y lengua electrónica.....	7
2. VENTAJAS DEL USO DE ARRAYS DE SENSORES. ....	12
2.1. <i>Arrays de sensores redundantes.</i> .....	13
2.3. <i>Arrays de sensores con sensibilidad cruzada.</i> .....	15
3. QUIMIOMETRÍA.....	18
3.1. <i>Pre-procesado de datos.</i> .....	18
3.2. <i>Análisis de Componentes Principales (PCA).</i> .....	21
3.2.1. Cálculos matemáticos.....	22
3.3. <i>Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)</i> .....	26
3.3.1. Objetivo de la Regresión PLS: Predecir Y a Partir de X.....	27
3.3.2. Calculo de PLS.....	28
3.3.3. Gráficos PLS. Evaluación de los modelos de predicción PLS. ....	30
3.4. <i>Redes Neuronales Artificiales (ANN).</i> .....	32
4. TIPOS DE LENGUAS ELECTRÓNICAS.....	34
4.1. <i>Lenguas electrónicas Potenciométricas.</i> .....	37
4.1.1. Principio de medida.....	37
4.2. <i>Lenguas electrónicas Impedimétricas.</i> .....	44
4.3. <i>Lenguas electrónicas Voltamétricas.</i> .....	46
4.3.1. Principio de medida.....	47
4.3.2. Lenguas electrónicas voltamétricas fabricados con electrodos metálicos planos. .	56
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>65</b>
<i>Objetivos</i> .....	67

<b>CAPÍTULO 1:</b>	<b>69</b>
<b>LA LENGUA ELECTRÓNICA Y LOS EQUIPOS DE MEDIDA.</b>	<b>69</b>
1.1. LA LENGUA ELECTRÓNICA.	71
1.1.1. <i>Uso y limpieza de los electrodos.</i>	72
1.2. PROPUESTAS DE DESARROLLO DE NUEVOS EQUIPOS DE MEDIDA.	73
1.2.1. <i>Primer prototipo de medida</i>	73
1.2.1.1. Componentes electrónicos.	75
1.2.1.2. Limitaciones del prototipo.	77
1.2.2. <i>Segundo prototipo de medida</i>	77
1.2.2.1. Componentes electrónicos.	80
1.2.2.2. Software de la aplicación.	81
<b>CAPÍTULO 2:</b>	<b>85</b>
<b>MÉTODO PARA EL DISEÑO DE PULSOS PARA LAS LENGUAS ELECTRÓNICAS</b>	
<b>VOLTAMÉTRICAS.</b>	<b>85</b>
2.1. INTRODUCCIÓN.	87
2.2. INTENSIDAD DE LA CORRIENTE A TRAVÉS DE UNA DISOLUCIÓN.	89
2.3. EXPERIMENTAL.	94
2.3.2. <i>Preparación de las muestras.</i>	94
2.3.2. <i>El sistema electrónico y preparación de la lengua electrónica.</i>	96
2.4. ESTUDIO ELECTROQUÍMICO.	96
2.4.1. <i>Estudio de la intensidad de corriente farádica y no-farádica.</i>	96
2.4.2. <i>Estudios mediante voltametría cíclica.</i>	99
2.4.3. <i>Diseño del tren de pulsos.</i>	100
2.4.3.1. <i>Pulsos LAPV y SAPV.</i>	101
2.4.3.2. <i>Pulso inteligente para el sistema reversible</i>	102
2.5. RESULTADOS.	107
2.6. CONCLUSIONES.	115
2.7. CONCLUSIONS.	117

<b>CAPÍTULO 3:</b>	<b>119</b>
<b>DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SIMULANTES DE AGENTES NERVIOSOS MEDIANTE EL USO DE LENGUAS ELECTRÓNICAS</b>	<b>119</b>
3.1. INTRODUCCIÓN.	121
3.2. EXPERIMENTAL.	126
3.2.1. <i>Preparación de muestras.</i>	126
3.2.2. <i>Principio y procedimiento de medida.</i>	129
3.2.3. <i>Tratamiento de los datos.</i>	131
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	132
3.3.1. <i>Estudios voltamperometría.</i>	132
3.3.2. <i>Formación de clústers mediante PCA.</i>	136
3.3.3. <i>Clasificación mediante redes neuronales artificiales.</i>	137
3.3.4. <i>Análisis cuantitativo mediante PLS.</i>	139
3.4. CONCLUSIONES.	143
3.5. CONCLUSIONS.	145
<b>CAPÍTULO 4:</b>	<b>147</b>
<b>DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ANIONES NITRATO, NITRITO Y CLORURO EN CARNE PICADA</b>	<b>147</b>
4.1. INTRODUCCIÓN.	149
4.2. EXPERIMENTAL.	152
4.2.1. <i>Preparación de las muestras.</i>	152
4.2.2. <i>Principio y procedimiento de medida.</i>	154
4.2.3. <i>Tratamiento de datos.</i>	155
4.3. ESTUDIOS DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA.	156
4.4. DISEÑO DEL TREN DE PULSOS APLICADO.	160
4.5. RESULTADOS.	164
4.5.1. <i>Predicción de la concentración en las salmueras.</i>	164
4.5.2. <i>Predicción de la concentración de sales en muestras de carne picada.</i>	168

4.6. CONCLUSIONES. ....	173
4.7. CONCLUSIONS.....	175
<b>CAPÍTULO 5: .....</b>	<b>177</b>
<b>LENGUA ELECTRÓNICA PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD EN EL PROCESO DE DEPURACIÓN DE LAS AGUAS RESIDUALES .....</b>	<b>177</b>
5.1. INTRODUCCIÓN. ....	179
5.2. EXPERIMENTAL.....	182
5.2.1. Descripción de la planta piloto. ....	182
5.2.2. Muestreo de las aguas residuales y métodos analíticos. ....	183
5.2.3. Procedimiento de medida. ....	184
5.2.4. Tratamiento de datos.....	185
5.3. ESTUDIOS DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA. ....	185
5.4. RESULTADOS. ....	192
5.4.1. Estudios que utilizan la lengua electrónica. ....	192
5.4.3. Análisis de PLS.....	193
5.5. CONCLUSIONES. ....	201
5.6. CONCLUSIONS.....	203
<b>CAPÍTULO 6: .....</b>	<b>205</b>
<b>LENGUA ELECTRÓNICA PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA MADURACIÓN DE LA UVA Y EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL MOSTO. ....</b>	<b>205</b>
6.1. INTRODUCCIÓN. ....	207
6.2. EXPERIMENTAL.....	209
6.2.1. Preparación de muestras. ....	209
6.2.2. Caracterización Fisicoquímica de las muestras. ....	210
6.2.3. La lengua electrónica. ....	210
6.2.3.1. Procedimiento de medida. ....	211
6.3. RESULTADOS. ....	214
6.3.1. Maduración de la uva. ....	214



6.3.1.1. Diferenciación entre distintas variedades de uva. ....	214
6.3.1.2. Modelos de PLS para cuantificar el grado de madurez de las uvas. ....	216
<b>6.3.2. Proceso de Fermentación. ....</b>	<b>219</b>
6.3.2.1. Monitorización en un mapa. ....	219
6.3.2.1. Estudios de PLS.....	221
<b>6.4. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>223</b>
<b>6.5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>225</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>227</b>
<b>GENERAL CONCLUSIONS .....</b>	<b>231</b>



## **Introducción**



## 1. Concepto lengua electrónica

### 1.1. Sistema del gusto biológico.

En 1760, el filósofo Immanuel Kant propuso que nuestro conocimiento del mundo exterior depende de nuestras formas de percepción. Para definir lo que es "extrasensorial" necesitamos definir lo que es "sensorial". Tradicionalmente, hay cinco sentidos humanos: vista, tacto, oído, olfato y gusto. Cada uno de los sentidos está formado por células especializadas que tienen receptores que reaccionan a estímulos específicos. Estas células están conectadas por medio del sistema nervioso al cerebro. Las sensaciones se detectan de forma primitiva en las células y se integran como sensaciones en el sistema nervioso. La vista es probablemente el sentido más desarrollado de los seres humanos, seguido inmediatamente por la audición. Los tres primeros sentidos de la clasificación son considerados físicos, pues estos se adaptan a percibir estímulos del tipo físico; mientras que los dos últimos son capaces de detectar cambios en la composición química del entorno, de ahí que se consideren sentidos químicos.

Recientemente, la comunidad científica se ha volcado en el intento de reproducir estos sentidos químicos de forma artificial. No obstante, la tarea de diseñar narices o lenguas artificiales resulta un tanto compleja, debido fundamentalmente a que el mecanismo natural de percepción química no está totalmente dilucidado aun<sup>1</sup>. No existe una relación directa entre la estructura de las moléculas y el estímulo que se percibe del contacto con ellas, esto es, moléculas con estructuras similares pueden causar distinta impresión (algunas partes de moléculas de hidrocarburos son dulces y otras no); y por el contrario, moléculas con grupos

---

<sup>1</sup> Y. Huang, X. Chen, M. Hoon, J. Chandrashekar, W. Guo, D. Trankner, N. Ryba, C. Zuker. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* (2006) 442, 934.

funcionales diferentes pueden percibirse de forma similar (partes de carbohidratos son dulces y el acetato de plomo también). Más aun, algunos efectos adicionales pueden presentarse, como sinergismo, antagonismo, enmascaramiento, entre otros efectos.

### 1.1.1. El sentido del gusto

Los receptores para el gusto son las papilas gustativas que se encuentran principalmente en la lengua, pero también están localizadas en el paladar y cerca de la faringe. Las papilas gustativas pueden detectar cuatro gustos básicos: salado, dulce, amargo, y agrio. La lengua también puede detectar un sabor llamado "umami"<sup>2</sup> por receptores sensibles a los aminoácidos.

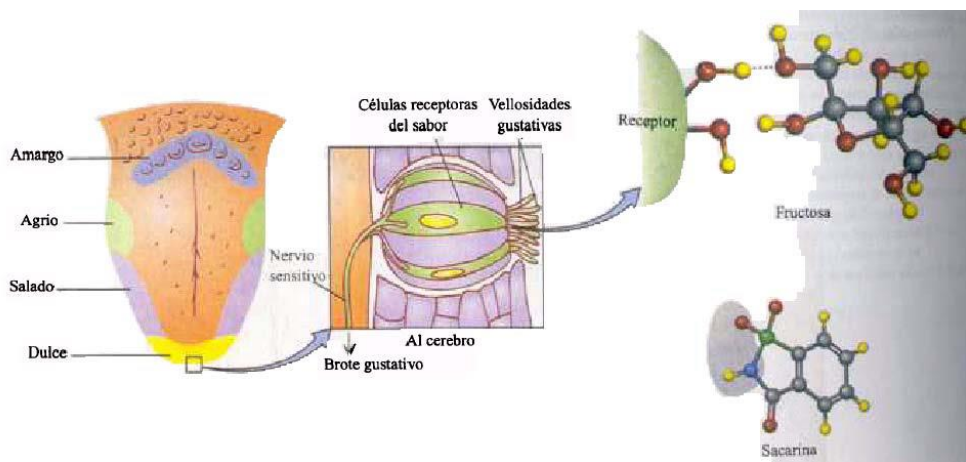


Figura 1. Sabores en la lengua biológica.

Generalmente, las papilas gustativas en la punta de la lengua son sensibles a los gustos dulces, mientras que las papilas en la parte posterior de la lengua son

<sup>2</sup> Y. Kawamura and M.R. Kare (eds.) Umami: A basic Taste, Marcel Dekker, New York, (1987).

sensibles a los gustos amargos. Las papilas gustativas en la parte superior y a los lados de la lengua son sensibles a los gustos salados y ácidos.

No se conoce el mecanismo exacto por el cual una molécula de sabor estimula a una célula del gusto, pero para que una molécula llegue a los brotes gustativos debe ser soluble en agua. Las moléculas que evocan un sabor se conocen como sápidas (del latín *sapere*, con sabor). Los sabores particulares son producidos por las unidades saporíferas de las moléculas. La unidad saporífera de lo dulce recibe el nombre glucóforo<sup>3</sup>. Se cree que el glucóforo se une a su proteína receptora y forma enlaces de hidrógeno. La sacarina ( $C_7H_5O_3NS$ ), un sustituto sintético del azúcar, contiene un glucóforo semejante a los del azúcar, cuando el átomo de H que está unido al átomo de N en la sacarina se reemplaza por un grupo metilo ( $CH_3$ ), se pierde el sabor dulce. En la Figura 1 se muestra un esquema del proceso de identificación del gusto. Las células receptoras de sabor se encuentran en distintas áreas de la lengua. En el ejemplo, la unidad saporífera de fructosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) forma enlaces de hidrógeno con el sitio receptor en los brotes de sabor dulce. La sacarina contiene una unidad saporífera semejante (el área sombreada) y por lo tanto evoca una respuesta equivalente de las células del sabor dulce. Las células receptoras generan una señal nerviosa que se transmite al cerebro por medio de los nervios sensitivos donde, por medio de una red de neuronas, se puede reconocer el sabor aplicando la memoria de anteriores tomas. El sentido del gusto funciona en coordinación con el sentido del olfato. El número de papilas varía de una persona a otra, pero un mayor número de papilas aumenta la sensibilidad a los sabores.

---

<sup>3</sup> R. Chang. Química. 6ª ed. McGraw-Hill (1998).

## 1.2. Definición de lengua electrónica.

De acuerdo con la reciente definición de la IUPAC<sup>4</sup>, una lengua electrónica es "un sistema multisensor, que consiste en un conjunto de sensores que poseen una baja selectividad y que utilizan unos procedimientos matemáticos avanzados para el procesamiento de las señales obtenidas. Estos procedimientos matemáticos están basados en la formación de Patrones de Reconocimiento y/o Análisis de Datos Multivariados, como son las Redes Neuronales Artificiales (RNA), los Análisis por Componentes Principales (PCA), etc". Por lo tanto, la lengua electrónica es un sistema de análisis aplicado al análisis muestras líquidas, formado por conjunto de sensores, capaces de generar información multidimensional, que junto con el uso de herramientas de procesamiento quimiométricas, permiten extraer la información de estos datos complejos.

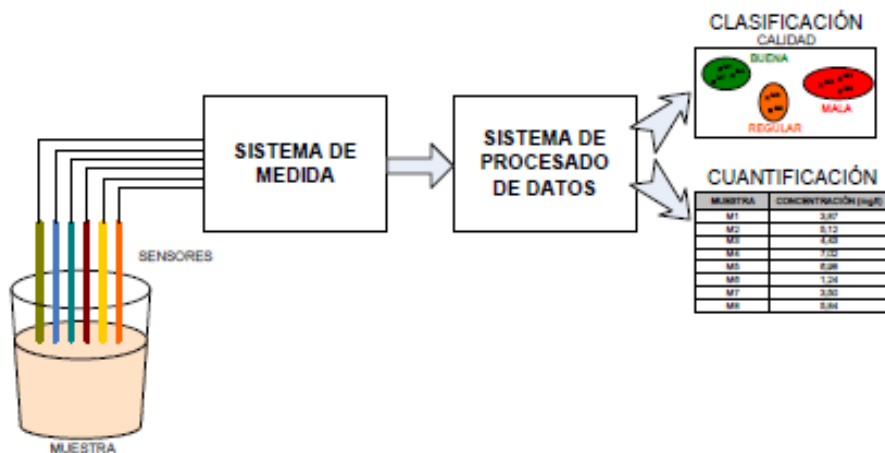


Figura 2. Esquema lengua electrónica

<sup>4</sup> Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, A. D'Amico. Non-specific sensor arrays "electronic tongue" for chemical analysis of liquids. Pure Appl. Chem. (2005) 77, 1965.



Según lo acordado por los primeros laboratorios que trabajan en el campo<sup>5</sup>, la lengua electrónica están formadas por:

- un conjunto de sensores no-específicos, sensores químicos poco selectivos con especificidad parcial (sensibilidad cruzada) hacia los diferentes compuestos en una solución ,
- y una herramienta quimiométrica apropiada para el procesamiento de los datos".

#### *1.2.1. Analogía sistema gustativo humano y lengua electrónica*

Al igual que ocurre en los sistemas biológicos, ya sea el sentido del olfato o del gusto, la sensibilidad cruzada, es de interés prioritario, ya que es donde se encuentra el poder del enfoque propuesto.

Por ejemplo, en el sentido del olfato, los animales no poseen los miles de receptores necesarios para distinguir entre todos los aromas existentes y los olores, de hecho, la situación es todo lo contrario: receptores de grupo que sólo difieren ligeramente, simplemente proporcionan respuestas a ciertas especies, un poco mayores que los sensores que se encuentran a su alrededor. A un olor determinado, el sentido del olfato proporciona un patrón de respuesta complejo, formado por un amplio conjunto de respuestas individuales que poseen una sensibilidad cruzada. Después de esto, es el cerebro el que procesa los datos complejos, y lleva a cabo el reconocimiento, identificación o cuantificación. Cada etapa de nuestro sentido, tiene su análogo correspondiente en la lengua electrónica. Como muestra la Figura 3, las papilas gustativas estarían representadas en los sensores que son los que producen la señal. Esta señal que viaja por las neuronas al cerebro, tienen su análogo en los procesos de

---

<sup>5</sup> M. Holmberg, M. Eriksson, C. Krantz-Rulcker, T. Artursson, F. Winqvist, A. Lloyd-Spetz, I. Lundstrom, Second workshop of the second network on artificial olfactory sensing (NOSE II). Sens. Actuators B: Chem (2004) 101, 213.

almacenamiento de datos y en los métodos de análisis, respectivamente, obteniendo así una sensación o un patrón de respuesta.

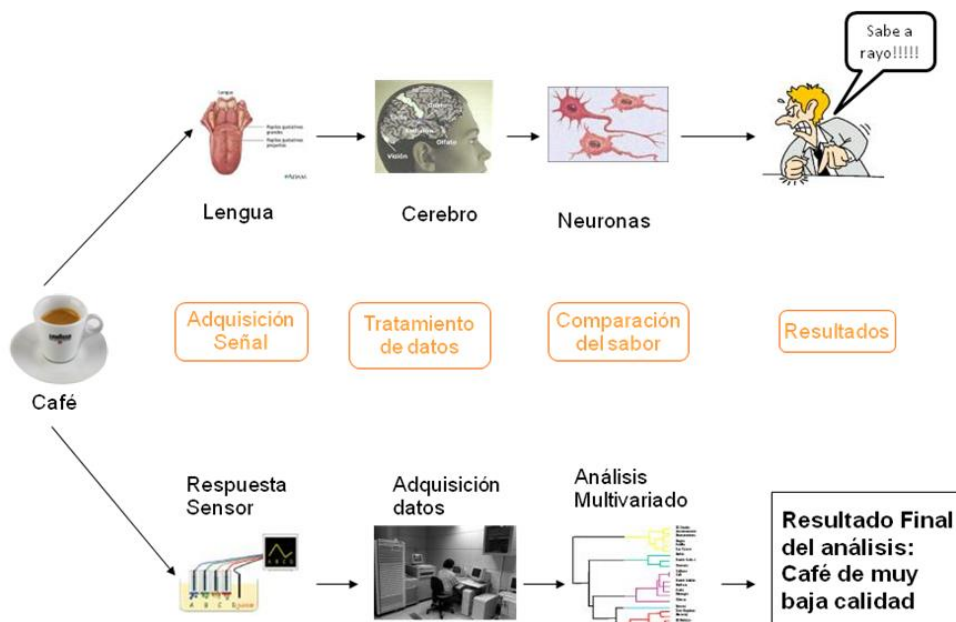


Figura 3. Analogía del sistema gustativo humano con la lengua electrónica.

De esta manera, los receptores pueden responder a varios estímulos de diversa naturaleza, siendo este enfoque global la manera de identificar cientos o miles de situaciones a partir de un número limitado de receptores<sup>6</sup>. Esta estrategia subyacente, también presente en el sentido del gusto o el tacto, es la que inspira las narices electrónicas y lenguas electrónicas, para proporcionar una información muy rica en el campo de los sensores que hace posible el desarrollo de aplicaciones especiales<sup>7</sup>. Las narices electrónicas, son los primeros sensores biomiméticos que se desarrollaron, ya que se inspiraron claramente en

<sup>6</sup> K. C. Persaud. Electronic gas and odour detectors that mimic chemoreception in animals. Trends Anal. Chem. (1992) 11, 61.

<sup>7</sup> Y. Vlasov, A. Legin, Fresenius J. Non-selective chemical sensors in analytical chemistry: from "electronic nose" to "electronic tongue". Anal. Chem. (1998) 361, 255.

el olfato de los animales, y rápidamente han evolucionado, permitiendo el desarrollo de interesantes aplicaciones en distintos campos<sup>8</sup>.

No hay duda de que el principal objetivo, en el campo de los sensores, es la mejora de la selectividad, propiedad analítica principal, sobre todo si se tiene que integrar el uso de sensores en un funcionamiento autónomo, sin ningún tipo de pre-tratamiento de la muestra o eliminación de especies interferentes. Por el contrario, los nuevos procedimientos bioinspirados, se basan en el uso de una serie de sensores no específicos, que responden a los iones primarios y sus interferentes, junto con el uso de herramientas quimiométricas para el tratamiento de los datos mediante análisis multivariantes, lo que permite extraer la información de los diferentes componentes presentes<sup>9</sup>. El propósito de las herramientas de procesamiento varía en función de la aplicación. Se pueden identificar una especie química, o determinar su concentración sin necesidad de eliminar interferencias. El punto clave es, que los datos multidimensionales generados, que comprenden la información necesaria sobre el sistema, y que los datos de orden superior, no tienen ninguna colinealidad (gracias al supuesto de sensibilidad cruzada).

Dado que todos los sensores que se usan en el array pueden responder a todos los analitos, se genera una gran cantidad de datos complejos, que deben ser procesados mediante un enfoque de calibración multivariante. La quimiometría es la encargada de la extracción de las características importantes y de su transformación en la información buscada. Este acoplamiento de sensores electroquímicos con la quimiometría, ya identificado como uno de los métodos

---

<sup>8</sup> J.W. Gardner, P. N. Bartlett, *Electronic Noses. Principles and Applications*. Oxford University Press, Oxford (1999).

<sup>9</sup> V. Pravdová , M. Pravda, G. G. Guilbault. Role of chemometrics for electrochemical sensors. *Anal. Lett.* (2002) 35, 2389.

recomendados para mejorar el rendimiento de los sensores<sup>10</sup>, representa también una consolidada línea de investigación en el campo del electroanálisis.

Las herramientas quimiométricas utilizadas en lenguas electrónicas son esencialmente las mismas que las que se utilizadas en los sistemas de nariz electrónica. Básicamente, existen ciertos algoritmos de procesamiento que están más indicados para fines de identificación o clasificación, tales como el Análisis de Componentes Principales (PCA) que se utilizan para aplicaciones cualitativas y otros procedimientos, por ejemplo, el uso de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), especialmente diseñado para fines de cuantificación y se utilizan principalmente para aplicaciones de multideterminación<sup>11</sup>. Las variantes quimiométricas mencionadas, son las técnicas convencionales de reconocimiento de patrones, principalmente de naturaleza lineal. Dichas técnicas pueden presentar limitaciones cuando se consideran las tendencias no lineales que proporcionan los sensores en sus respuestas. Para mejorar los resultados, los investigadores han propuesto el uso de Redes Neuronales Artificiales (ANN), que es una técnica informática, especialmente adecuada para el análisis de las respuestas no-lineales y muy relacionadas con el reconocimiento de patrones humanos.

Esta nueva tecnología ha sido aplicada en muchos campos de interés, como:

- **Industria Alimenticia**

Controles de calidad durante la producción y el almacenamiento (aguas minerales<sup>12,13</sup>, vinos<sup>14</sup>, zumos<sup>15,16</sup>, café, leches<sup>17</sup>, etc.)

---

<sup>10</sup> B. K. Lavine, J. Workman. Chemometrics. Anal. Chem. (2002) 74, 2763.

<sup>11</sup> P. Ciosek, W. Wróblewski. The analysis of sensor array data with various pattern recognition techniques. Sens. Actuators B: Chem (2006) 114, 85.

<sup>12</sup> R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. Garcia-Breijo, L. Gil, J. Ibáñez, E. Llobet. An "electronic tongue" design for the qualitative analysis of natural waters. Sens. Actuators B: Chem (2005) 104, 302.

Optimización de bioreactores

Control de los procesos de envejecimiento (quesos, vinos, carne<sup>18</sup>)

Control automático del sabor

- **Medicina**

Diagnósticos no invasivos (orina, sudor, saliva, etc.)<sup>19,20,21</sup> Monitoreo clínico *in vivo*

Sabor de los productos farmacéuticos<sup>22</sup> (enmascaramiento de la amargura, etc.)

- **Seguridad**

Detección de armas químicas y biológicas<sup>23</sup>

---

<sup>13</sup> S. Zhuikov. Solid-state sensors monitoring parameters of water quality for the next generation of wireless sensor networks. *Sens. and Actuators B: Chem* (2012) 161, 1.

<sup>14</sup> N. Lopez de Lerma, A. Bellincontro, F. Mencarelli, J. Moreno, R. A. Peinado. Use of electronic nose, validated by GC-MS, to establish the optimum off-vine dehydration time of wine grapes. *Food Chem.* (2012) 130, 447.

<sup>15</sup> L.G. Dias, A.M. Peres, T.P. Barcelos, J. Samorais, A.A.S.C. Machado. Semi-quantitative and quantitative analysis of soft drinks using an electronic tongue. *Sens. Actuators B: Chem* (2011) 154, 111.

<sup>16</sup> P. Hartyáni, I. Dalmadi, Z. Cserhalmi, D.B. Kántor, M. Tóth-Markus, Á. Sass-Kiss. Physical-chemical and sensory properties of pulsed electric field and high hydrostatic pressure treated citrus juices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* (2011) 12, 255.

<sup>17</sup> Z. Wei, J. Wang. Detection of antibiotic residues in bovine milk by a voltammetric electronic tongue system. *Anal. Chim. Acta* (2011) 694, 46.

<sup>18</sup> R. H. Labrador, R. Masot, M. Alcañiz, D. Baigts, J. Soto, R. Martínez-Mañez, E. García-Breijo, L. Gil, J. M. Barat. Prediction of NaCl, nitrate and nitrite contents in minced meat by using a voltammetric electronic tongue and an impedimetric sensor. *Food Chem.* (2010) 122, 864.

<sup>19</sup> A. Goodey, J. Lavigne, S. Savoy, M. Rodriguez, T. Curey, A. Tsao, G. Simmons, J. Wright, S. Yoo, Y. Sohn, E. Anslyn, J. Shear, D. Neikirk, J. McDevitt. Development of Multi-analyte Sensor Arrays Composed of Chemically Derivatized Polymeric Microspheres Localized in Micromachined Cavities. *J. Am. Chem. Soc.* (2001) 123, 2559.

<sup>20</sup> Y. Sohn, A. Goodey, E. Anslyn, J. McDevitt, J. Shear, D. Neikirk. A microbead array chemical sensor using capillary-based sample introduction: toward the development of an "electronic tongue". *Biosens. Bioelectron.* (2005) 21, 303.

<sup>21</sup> M. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle. Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples. *Biosens. Bioelectron.* (2007) 22, 2171.

<sup>22</sup> K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitzkreutz. Taste sensing systems (electronic tongues) for pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* (2011) 417, 256.

Detección de drogas y explosivos

- ***Vigilancia ambiental***

Monitorización de la contaminación industrial y agrícola

Identificación de sustancias tóxicas

Detección de fugas peligrosas

- ***Industria Química***

Pureza de productos

Detección de grupos funcionales

A continuación se presenta una relación de análisis realizados sobre muestras específicas mediante el uso de lenguas electrónicas.

## **2. Ventajas del uso de arrays de sensores.**

Los arrays de sensores son un claro ejemplo de integración en electroanálisis. Además de unir diferentes elementos de análisis en una sola pieza, el uso de arrays de sensores lleva a ciertas ventajas<sup>24</sup>. En primer lugar, los arrays de sensores generan de manera sencilla y debido a su naturaleza, un elevado volumen de datos óptimos para el análisis de datos multicomponente. Para una misma muestra, se puede determinar diferentes analitos de forma paralela, si la selectividad es una premisa. Si no, el uso de datos multicomponentes, hace posible la interpretación de composiciones complejas, la resolución de mezclas, mediante el análisis de las contribuciones de las especies principales y sus interferentes, o incluso, para distinguir entre las respuestas con información relevante o sin ella. Una razón adicional para la popularización de los arrays de

---

<sup>23</sup> I. Campos, L. Gil, R. Martínez-Máñez, J. Soto, J.L. Vivancos. Use of a voltammetric electronic tongue for predicting levels of nerve agent mimics. *Procedia Chemistry* (2009) 1, 325-328.

<sup>24</sup> S. Alegret, in *Integrated Analytical Systems* (Ed: S. Alegret), Elsevier, Amsterdam, (2003) 1.

sensores es la disponibilidad del uso de canales múltiples en electroquímica, fácilmente automatizable en un ordenador, facilitando de este modo el almacenamiento, visualización y el procesamiento de datos complejos. En el uso de arrays de sensores, se pueden distinguir tres grandes variantes, en función de su objetivo principal: determinar si las respuestas de los sensores son equivalentes, completamente independientes o si presentan selectividad cruzada.

### **2.1. Arrays de sensores redundantes.**

El uso de sensores que ofrecen información redundante es un ejemplo del uso inteligente de sensores para el diagnóstico de averías y/o detectar la degradación de las respuestas del sensor. Normalmente se emplea un conjunto de sensores equivalentes, es decir, que responden a la misma especie, y que pueden ser iguales o con esquemas diferentes de transducción. Su uso puede proporcionar confianza adicional en las medidas finales, en la validación de los resultados o en la confirmación de que en la técnica usada, está presente o no el efecto matriz. Una segunda posibilidad, de alguna manera conectada a la anterior, es llevar a cabo la detección de fallos de un sistema de análisis. En principio, un sistema de sensores redundantes proporciona resultados con mayor precisión y estabilidad de la generaría cada sensor por sí solo. De hecho, el uso de un array de sensores redundantes puede ser el medio para la auto-diagnóstico de los resultados obtenidos.

Por ejemplo, si un sólo sensor es el que no funciona correctamente debido a una conexión eléctrica defectuosa, a su degradación de la membrana, a la presencia de burbujas de aire, etc., puede ser identificado como un fallo individual, y por tanto la respuesta relacionada a este fallo, puede ser descartada y/o remplazada automáticamente del patrón. Todo lo contrario, puede ocurrir cuando el array está dando respuestas anormales, atribuibles a un fallo en el sistema operativo

como la pérdida de líquido, la introducción de muestras defectuosas, el ruido eléctrico anormal, etc., hacer un uso apropiado de la información proporcionada en tiempo real, empleando rutinas controladas automáticamente, pueden mejorar sustancialmente el rendimiento de los sistemas de análisis<sup>25</sup>. Una tercera posibilidad, es el uso de un array de sensores iguales en paralelo, lo que puede ser utilizado para la monitorización de la concentración. Si los sensores están distribuidos en el espacio de acuerdo a un patrón predefinido, después de la medida, se pueden obtener, para un determinado analito, un perfil de concentraciones o una imagen en 2D.

## **2.2. Arrays de sensores independientes.**

La variante de multideterminación típica utiliza un conjunto de sensores, es decir, cada sensor debe ser específico con el fin de realizar una serie de análisis en paralelo, proporciona una ganancia en el procesamiento de la muestra. Una sola operación, con una muestra, dará lugar a una batería de resultados, una variante interesante cuando el objetivo es su caracterización. Otras ventajas incluyen la reducción del uso de reactivos, energía y espacio, y un menor coste. Un típico ejemplo, puede ser el uso de un array de electrodos ión selectivos (ISE) en serie para llevar a cabo una determinación múltiple de varios analitos como por ejemplo, la determinación de los cationes alcalinos y alcalinotérreos. En caso de que aparezcan interferencias, o respuestas cruzadas, en las respuestas de los diferentes sensores utilizados, puede utilizarse métodos de separación, como por ejemplo, por cromatografía, para minimizar cualquier efecto de respuesta cruzada<sup>26</sup>. Un ejemplo simple de ello, fue la determinación  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el

---

<sup>25</sup> J. C. Seiter, M. D. DeGrandpre. Redundant chemical sensors for calibration-impossible applications. *Talanta* (2001) 54, 99.

<sup>26</sup> H. Sheen, T. J. Cardwell, R.W. Cattrall. Use of an electronic tongue based on All-Solid-State potentiometric sensors for the quantitation of alkaline ion. *Analyst* (1998) 123, 2181.



sudor, en la búsqueda para el diagnóstico de la fibrosis quística de recién nacidos, que proporcionan una mayor confianza que el diagnóstico que suele realizarse basado sólo en pruebas de conductividad<sup>27</sup>. Como se ha comentado, este enfoque sólo dará resultados correctos si la condición de especificidad o la ausencia de interferencias se cumplen, es decir, cada sensor responde a un único componente en una mezcla multicomponente. Sin embargo, existe una nueva y exitosa variante para esta filosofía. Las matrices de afinidad paralela, tanto de los ácidos nucleicos, ADN o ARN, o de anticuerpos, de los cuales, los dispositivos más eficaces son los sistemas automatizados de microarrays, que normalmente utilizan la transducción óptica, como por ejemplo, la fluorescencia. También se han descrito metodologías basadas en sensores electroquímicos<sup>28</sup>.

### **2.3. Arrays de sensores con sensibilidad cruzada.**

Esta tercera variante, formada por sistemas bioinspirados, es la base de lenguas electrónicas. En una situación ideal, un array de sensores formado por un conjunto de sensores con sensibilidades ligeramente diferentes, no autocorrelacionados, puede generar un sistema sobre determinado que debería hacer posible la determinación simultánea de una serie de analitos en una mezcla compleja. Para ello, la selectividad limitada de cada sensor individual, puede ser compensada a través del procesamiento de datos, lo que permite la determinación de una especie en presencia de sus interferentes. Además, hay que tener en cuenta que algunas de las necesidades más recientes para obtener información de análisis no se refieren a una determinación cuantitativa de alta

---

<sup>27</sup> A. Lynch, D. Diamond, M. Leader. Bio-sensing textiles - Wearable Chemical Biosensors for Health Monitoring. *Analyst* (2000) 125, 2264.

<sup>28</sup> K. M. Roth, K. Peyvan, K. R. Schwarzkopf, A. Ghindilis, Bio-sensing textiles - Wearable Chemical Biosensors for Health Monitoring. *Electroanal.* (2006) 18, 1982.

precisión de un determinado compuesto, sino a un efecto general o de la percepción, con el fin de tomar una decisión rápida. Ejemplos de estos son la frescura de alimentos, la toxicidad, el olor, el sabor, la contaminación, etc. Estas situaciones han de ser gobernadas por los algoritmos de identificación o clasificación, es decir, tratamientos de procesado de datos relacionados con la quimiometría. De esta manera, los primeros sistemas de lengua electrónica empleaban arrays de sensores en disolución no-específicos, junto con herramientas de reconocimiento de patrones, tales como PCA, y se aplicaron al análisis cualitativo de las diferentes bebidas, imitando así el gusto humano.

Las primeras contribuciones de las lenguas electrónicas se originó con la colaboración de dos grupos de sensores en Europa, el profesor Vlasov que pertenece a la Universidad de San Petersburgo y D'Amico de la Universidad Tor Vergata en Roma<sup>29</sup>, que emplea arrays de ISE. Poco después, el grupo sueco del profesor Winquist en Linköping, propuso un sistema equivalente que permitía la clasificación de las soluciones con diferentes propiedades redox. Esta vez las medidas de voltamperometría se originaron sobre un array de diferentes electrodos metálicos<sup>30</sup>.

Cuando hay una necesidad de información de una especie cuyo sensor selectivo no ha sido previamente desarrollado, y en ausencia de cualquier otra posibilidad, se puede utilizar la información de un número de sensores, y tratar de correlacionar la información disponible con la concentración buscada. Esta metodología indirecta puede ser adecuada para las determinaciones analíticas complejas (por ejemplo, la materia orgánica), o para aquellos de carácter general,

---

<sup>29</sup> A. Legin, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, C. Di Natale, F. Davide, A. D'Amico. Tasting of beverages using an electronic tongue. *Sens. Actuators B: Chem* (1997) 44, 291.

<sup>30</sup> F. Winquist, P. Wide, I. Lundstrom. An electronic tongue based on voltammetry. *Anal. Chim. Acta* (1997) 357, 21.

tales como toxicidad, grado de madurez, etc, y, obviamente, es forzada por la necesidad de la generación rápida y automatizada de la información química. A partir de este momento, un campo principal de aplicación de las lenguas electrónicas, y también las narices electrónicas, fue el análisis de alimentos y bebidas. La mayoría de las aplicaciones, incluyen la identificación y clasificación de las bebidas y variantes de comida, o la percepción de calidad de los alimentos, y han sido especialmente aplicadas en la industria alimentaria, principalmente, para proporcionar un equivalente automatizado de los paneles sensoriales de los expertos humanos<sup>31</sup>. El uso de la lengua electrónica, se extendió rápidamente a los campos vecinos, por ejemplo, para aplicaciones de monitorización de agua. Esta funcionalidad, también generaron nuevas variantes, incluyendo el reconocimiento, identificación, clasificación y la determinación cuantitativa de las concentraciones de componentes múltiples<sup>32</sup>. Gracias a este abanico de posibilidades, las lenguas electrónicas están empezando a resultar útiles como dispositivos para el control de calidad en la industria alimentaria, en aplicaciones para el medio ambiente, junto con algunas otras aplicaciones tales como monitorización y análisis de procesos clínicos. El potencial de estas nuevas herramientas se encuentra en los nuevos tipos de información analítica obtenidas, a diferencia de la simple suma de cada una de señales. Ejemplos de esto son la corrección del efecto matriz, la identificación de una variedad de muestras, o la correlación con una percepción de un panel de expertos sensoriales.

---

<sup>31</sup> A. K. Deisingh, D. C. Stone, M. Thompson. Applications of electronic noses and tongues in food analysis. *Int. J. Food Sci. Tech.* (2004) 39, 587.

<sup>32</sup> M. del Valle, in *Electrochemical Sensor Analysis* (Eds: S. Alegret, A. MerkoAi), Elsevier, Amsterdam (2007), p. 721.

### 3. Quimiometría.

Como ya se ha comentado anteriormente la quimiometría es una importante herramienta en el uso de lenguas electrónicas y no se entiende este último concepto sin el uso de dichas herramientas estadísticas.

En 1975, la Sociedad Internacional de la Quimiometría la definió como: *“la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos”*

Dicha disciplina abarca un amplio campo de métodos que pueden ser aplicados en química. Dentro de este se encuentran las herramientas de optimización de parámetros experimentales, diseño de experimentos, reconocimiento de patrones, etc.

De todas las técnicas pertenecientes a este campo, aquí hablaremos de las más utilizadas en el desarrollo de lenguas electrónicas como son:

- Pre-procesado de datos
- Análisis de Componentes principales
- Regresión por mínimos cuadrados parciales
- Redes Neuronales Artificiales.

#### 3.1. Pre-procesado de datos.

Una de las características principales de las lenguas electrónicas es la elevada cantidad de información, que si por una parte es una ventaja, también se puede convertir en un inconveniente ya que por una parte ralentiza el posterior tratamiento de los datos mediante las herramientas de análisis multivariante y por otra, mucha de la información extraída de las lenguas es redundante o poco

fiable. Por todo esto, diversos autores se han planteado el uso de algoritmos de compresión de datos de manera que solo la información que mejor describe el sistema sea la que se tenga en cuenta a la hora de analizarlo. Moreno-Baron et al.<sup>33</sup> y Gutés et al.<sup>34</sup> proponen un método basado en wavelets para comprimir los datos obtenidos de las medidas de voltametría diferencial de pulsos. Una vez aplicado el algoritmo wavelet, los autores proponen tomar únicamente los coeficientes correspondientes a las frecuencias bajas ya que dichas frecuencias son las que contienen la información relevante en este tipo de ensayos. De esta forma no solo se reduce el número de variables, sino que también se reduce el ruido de alta frecuencia.

En ocasiones antes de aplicar la herramienta de análisis multivariante es conveniente llevar a cabo un pequeño pre-procesado de los datos. El tipo de pre-procesado más adecuado depende de la naturaleza de los datos y de la técnica que se vaya a utilizar. El pre-procesado debe aplicarse tanto a los datos de las variables independientes ( $D_{ij}$ ) como a los de las variables dependientes ( $P_{ik}$ ). Las técnicas de pre-procesado más comunes son:

- Centrado con respecto a la media: esta técnica suele utilizarse cuando los datos presentan un desplazamiento con respecto al nivel cero que no aporta información relevante sobre las diferencias entre muestras. En este caso es conveniente eliminar dicho desplazamiento restando a cada

---

<sup>33</sup> L. Moreno-Baron, R. Cartas, A. Merkoci, S. Alegret, M. del Valle, L. Leija, P. R. Hernández, R. Muñoz. Application of the wavelet transform coupled with artificial neural networks for quantification purposes in a voltammetric electronic. *Sens. Actuators B: Chem* (2006) 113, 487.

<sup>34</sup> A. Gutés, F. Céspedes, R. Cartas, S. Alegret, M. del Valle, J. M. Gutiérrez, R. Muñoz. Multivariate calibration model from overlapping voltammetric signals employing wavelet neural networks. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* (2006) 83, 169.

medida el valor promedio de los datos de la variable independiente correspondiente, tal y como se indica en la Ecuación 1.

$$D_{CENij} = D_{ij} - D_{MEDj} \quad (1)$$

Siendo  $D_{MEDj}$  el valor medio de todas las muestras para la variable independiente  $X_j$  (ver Ecuación 2).

$$D_{MEDj} = \frac{\sum_{i=1}^M D_{ij}}{M} \quad (2)$$

- Estandarización: cuando los datos correspondientes a las variables independientes son de distinta naturaleza (sensores que miden distintos parámetros) puede resultar útil homogeneizar los datos dividiéndolos por la desviación estándar (ver Ecuación 3). De esta forma se le da la misma importancia a todos ellos independientemente de cuál sea su naturaleza.

$$D_{STDij} = \frac{D_{ij}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (D_{ij} - D_{MEDj})^2}{M - 1}}} \quad (3)$$

- Autoescalado: consiste en combinar las transformaciones de centrado y estandarización. Es decir, consiste en llevar a cabo una estandarización sobre datos que previamente han sido centrados con respecto a la media, tal y como aparece en la Ecuación 8. Para entender esta ecuación hay que tener en cuenta que la desviación estándar (cociente de la expresión de la Ecuación 8) de los datos antes y después del centrado es la misma.

$$D_{AUTOij} = \frac{D_{CENij}}{\sqrt{\frac{\sum_{I=1}^M (Di_j - D_{MEDj})^2}{M-1}}} \quad (4)$$

- Normalización: se utiliza para conseguir que los datos tengan un valor entre -1 y +1. Consiste en dividir los datos cada variable independiente por el máximo (en valor absoluto) de cada una de ellas.

$$D_{NORMij} = \frac{D_{ij}}{\max_j (|D_{ij}|)} \quad (5)$$

Las ecuaciones 1, 2, 3, 4 y 5 están referidas a los datos de las variables independientes ( $D_{ij}$ ). Las mismas expresiones deberían ser aplicadas a las variables dependientes ( $P_{ik}$ ).

### 3.2. Análisis de Componentes Principales (PCA).

La técnica de análisis de componentes principales es una de las herramientas más utilizadas en el campo de las lenguas electrónicas. Esta técnica es una herramienta matemática de compresión de datos mediante la conversión de los ejes de coordenadas que describen nuestro sistema en un nuevo sistema de coordenadas en el cual todos los nuevos ejes llamados componentes principales (PC) son ortogonales, ordenados todos ellos de manera que el primer componente, PC1, explique la mayor varianza posible, el segundo, PC2, el siguiente que más explique, y así sucesivamente.

### 3.2.1. Cálculos matemáticos.

El objetivo de esta técnica es descomponer el vector que define nuestro sistema  $x = [x_1, x_2, \dots, x_m]^T$ , en un nuevo vector  $z = [z_1, z_2, \dots, z_m]^T$  donde  $k < m$ <sup>35</sup>. El nuevo vector  $z$  se puede representar mediante una combinación lineal de las variables originales y tiene la forma:

$$x = \sum_{i=1}^m z_i u_i \quad (6)$$

Donde los coeficientes  $z_i$  se calculan:

$$z_i = u_i^T x \quad (7)$$

Esto corresponde a una rotación del sistema de coordenadas original,  $X$ , a un nuevo sistema de coordenadas dados por el  $Z$ .  $T$  reduce las dimensiones de los datos solamente un subconjunto ( $k < m$ ) de vectores de la base se guarda el  $u_i$ . El resto de coeficientes se sustituyen por las constantes  $b_i$  dando lugar a la siguiente aproximación de  $x$ :

$$\tilde{x} = \sum_{i=1}^M z_i u_i + \sum_{i=M+1}^d b_i u_i \quad (8)$$

Los vectores bases  $u_i$ , también llamados componentes principales son los vectores propios de la matriz de covarianza del conjunto de datos. Los componentes principales y los coeficientes  $b_i$  deben ser elegidos de manera que se obtenga la mejor aproximación al vector original  $X$ . Sin embargo, la reducción de la dimensionalidad de  $m$  a  $k$  causa un error en dicha aproximación. La suma de los

---

<sup>35</sup> C.M. Bishop. Neural Networks for Pattern Recognition. Oxford University Press Inc., New York, (1995).



cuadrados de los errores<sup>36</sup> sobre el conjunto de datos se reduce al mínimo si se seleccionan los vectores  $u_i$  que corresponden con los vectores de la matriz de covarianza de mayor valor. Como resultado de la transformación de PCA, el set de datos original se representa en pocas dimensiones (típicamente 2-3) y las medidas pueden ser representadas en un mismo sistema de coordenadas. La nueva gráfica de PCA demuestra la relación entre las diversas observaciones o experimentos. Las agrupaciones de los puntos de referencias en este diagrama sugieren algunas características comunes y se pueden utilizar para la clasificación. Una parte de las medidas disponibles se puede utilizar como sistema del entrenamiento para definir las clases, mientras que el resto podrá ser empleado en estudios de validación. Asumiendo que las  $n$  medidas se han utilizado para el entrenamiento y  $p$  para la validación. Los datos del entrenamiento se organizan en una sola matriz de la forma siguiente:

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & \cdots & x_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & \cdots & x_{nm} \end{pmatrix} \quad (9)$$

Donde cada fila en  $X$  representa una medida y el número de las columnas  $m$  es igual a la longitud de la secuencia de la medida. Puesto que la dimensionalidad de los datos originales es algo elevada, el análisis de componentes principales se aplica para obtener un nuevo conjunto de datos de una dimensión más baja. Siguiendo los pasos que se describen arriba, la matriz de covarianza se puede expresar como  $C = \text{cov}(X)$ , con  $\lambda_i$  como valores propios y  $u_i$  como vectores propios.

---

<sup>36</sup> C.M. Bishop. Neural Networks for Pattern Recognition. Oxford University Press Inc., New York, 1995.

Se puede observar los vectores  $u_i$  forma un sistema de coordenadas ortonormal  $U = [u_1, u_2, \dots, u_m]$ . Eso es  $U^T U = I$ . El conjunto de datos original se puede representar en el nuevo sistema usando la ecuación 7:  $Z = U^T X$ .

Después de esta transformación, podemos construir una nueva matriz de los datos de dimensión reducida con la ayuda de los valores propios o la matriz  $C$ . Esto se consigue seleccionando los valores más altos de  $\lambda_i$  puesto que corresponden a los componentes principales de mayor significación. El número de PC que se incluyen debe ser suficiente elevado para asegurar la buena separación entre las clases.

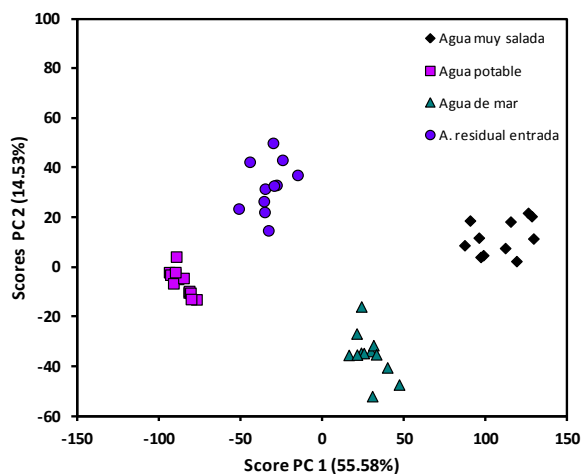


Figura 4. Gráfica de observaciones (scores) en PCA.

Los resultados de PCA se expresan como los parámetros de la observación (scores) y los pesos de las variables (loads). Para alcanzar la interpretación de los resultados, éstos se expresan gráficamente en dos dimensiones (PC1 y PC2), pero dependiendo de la aplicación o del resultado, algunos autores utilizan un diagrama tridimensional (PC1, PC2, PC3). En el gráfico de scores (Figura 4), se pueden observar las diferentes agrupaciones denominadas clusters, de modo que

los puntos que estén próximos en el plano PC1-PC2 tienen características comunes, y lo contrario si se encuentran alejados. Sin embargo, una representación gráfica simple podría conducir al engaño porque tenemos que recordar qué porcentaje de la información total asume cada uno de los parámetros. En este sentido, el componente PC1 se asocia siempre al porcentaje más alto de la varianza explicada, y entonces las variaciones en el eje PC1 tendrán mucha más relevancia que variaciones en el eje PC2 o el otro parámetro principal. El gráfico de los pesos (loads) proporciona la información en la relación al comportamiento de los sensores, de modo que si están cercanos en el gráfico signifique que hay correlación entre ellos y ofrecen una información similar, mientras que si están alejados la información es diferente. La posición de los puntos de dos sensores respecto del centro ofrece información significativa. Si están formando un ángulo pequeño respecto al centro significa que existe una correlación y que por tanto ofrecen información. Si forman un ángulo de aproximadamente  $180^\circ$ , significa que ambas variables poseen una correlación negativa, por lo que la información que ofrecen es contraria, es decir, si la señal de un sensor aumentara, la señal del otro disminuiría. Y por último, el caso de que los puntos experimentales de ambos sensores formen un ángulo aproximado de  $90^\circ$ , significa que los sensores ofrecen información ortogonal, es decir, que son independientes uno del otro y que no existe correlación entre ellos. En la Figura 5 se muestra un ejemplo de cada uno de los casos.

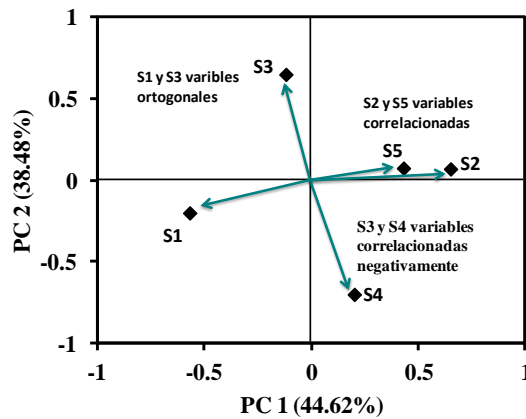


Figura 5. Gráfica de los pesos (*Loads*) de los sensores

Aunque en sentido estricto de proceso de datos el algoritmo PCA es una simple técnica de reducción de dimensiones, en la práctica se utiliza más bien como un método de clasificación de datos, porque en muchas ocasiones los resultados de los sistemas de narices y lengua electrónicas consisten en la representación bidimensional de un conjunto de medidas para ver si se pueden determinar agrupaciones (cluster) espontáneas entre las diferentes medidas realizadas previamente. De esta forma, el algoritmo PCA suele ser definido como un método de clasificación no supervisado y no paramétrico de reconocimiento de patrones.

### 3.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

La regresión por PLS es una técnica que generaliza y combina las características del análisis PCA y la regresión múltiple. El objetivo principal de PLS es predecir o analizar un conjunto de variables dependientes a partir de un conjunto de variables independientes u observables. La predicción se alcanza extrayendo de las variables observadas un conjunto de factores ortogonales denominados

variables latentes que representan el mejor poder predictivo sobre las variables dependientes. La regresión PLS es particularmente útil cuando se necesita predecir un conjunto de variables dependientes a partir de un conjunto grande de variables independientes (predictores). Este algoritmo fue desarrollado por Herman Wold en 1966, y en sus orígenes, la técnica fue aplicada fundamentalmente a las ciencias sociales, específicamente a la economía. Su popularidad ha aumentado al ser aplicada en el campo de la quimiometría<sup>37</sup> y en la evaluación sensorial<sup>38</sup>. Este algoritmo fue rápidamente acogido en el entorno estadístico. La principal diferencia con respecto a los métodos de Regresión de Componentes Principales (PCR) es que procura que los componentes principales contengan la mayor información para la matriz de predicción Y. Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (Y), obteniéndose variables latentes que actúan como coeficientes. Antes de realizar la descomposición en factores, las matrices X e Y se centran o autoescalan como en el caso de PCA. Cada una de las matrices se descompone simultáneamente en una suma de factores. La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los *scores* de los bloques X e Y.

### 3.3.1. *Objetivo de la Regresión PLS: Predecir Y a Partir de X.*

El objetivo de la regresión por PLS es predecir Y a partir de X y describir la estructura común de ambas matrices. Cuando Y es un vector y X es un rango completo, este objetivo podría lograrse utilizando la técnica básica de la

---

<sup>37</sup> S. Wold. Personal memories of the early PLS development. Chemometrics Intell. Lab. Syst. (2001) 58, 83.

<sup>38</sup> H. Martens, T. Naes. Multivariate calibration. Ed. Wiley. London (1989).

estadística: Regresión Múltiple Ordinaria. Pero cuando el número de predictores es grande comparado con el número de observaciones,  $X$  puede ser singular y el uso de regresión no puede ser factible debido a la multicolinealidad. Se han desarrollado diversas técnicas para resolver este problema. Una primera aproximación consiste en eliminar algunos de los predictores. Otra aproximación es utilizar la Regresión de Componentes Principales (PCR). La ortogonalidad de los componentes principales elimina los problemas de multicolinealidad pero permanece el problema de elegir el subconjunto óptimo de predictores. Una posible estrategia es mantener sólo unos pocos componentes, pero estos se eligen para expresar  $X$  más que para explicar  $Y$ , y por ello no garantiza que los componentes principales que explican  $X$  sean relevantes para  $Y$ .

En contraste, la regresión PLS encuentra los componentes de  $X$  que también son relevantes para  $Y$ . Concretamente, PLS busca un conjunto de componentes (variables latentes) que logren una descomposición simultánea de  $X$  e  $Y$  con la condición de que esos componentes expliquen tanto como sea posible la covarianza entre  $X$  e  $Y$ . Este paso generaliza el análisis PCA, porque es seguido por un paso de regresión donde la descomposición de  $X$  es utilizada para predecir  $Y$ .

### 3.3.2. *Calculo de PLS.*

Antes de realizar la descomposición en factores, las matrices  $X$  e  $Y$  se centran o autoescalan como en el caso del PCA. Cada una las matrices se descompone simultáneamente en una suma de  $a$  factores de forma que:

$$X = TP^T + E = \sum_{i=1}^a t_i p_i^T + E \quad (10)$$

$$Y = UQ^T + F = \sum_{i=1}^a u_i q_i^T + F \quad (11)$$

donde  $T$  es la matriz de *scores*,  $P$  la de *loadings* y  $E$  la matriz de residuales para la matriz de datos (matriz  $X$ ); mientras que  $U$  es la matriz de *scores*,  $Q$  la matriz de *loadings* y  $F$  la matriz de residuales para la matriz de la propiedad a determinar (matriz  $Y$ ). Si tenemos  $m$  muestras,  $a$  factores,  $k$  variables y  $p$  analitos, la dimensionalidad de la matriz es la siguiente:  $T$  y  $U$  ( $m \times a$ ),  $P^T$  ( $a \times k$ ) y  $Q^T$  ( $a \times p$ ). En este caso, los *loadings* no coinciden exactamente con la dirección de máxima variabilidad de las muestras como en el caso de PCA, ya que están corregidas para obtener la máxima capacidad para predecir la matriz  $Y$ .

La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los *scores* de los bloques  $X$  e  $Y$  de forma que para cada componente  $a$ , se cumple que

$$\hat{u}_a = b_a t_a \quad (12)$$

donde el símbolo  $\hat{\phantom{x}}$  indica que es un valor calculado (estimado) y  $b_a$  es el coeficiente de regresión para cada uno de los componentes. A partir de aquí se calcula el valor de  $Y$  utilizando la relación interna  $\hat{u}_a$

$$Y = TBQ^T + F \quad (13)$$

Donde  $B$  es la matriz de los regresores  $b_a$ , de dimensiones ( $a \times a$ ), y  $F$  la matriz de los residuos de  $Y$ .

En el caso de calcular una sola propiedad de la matriz  $Y$ , el algoritmo recibe el nombre de PLS1 y se determina simultáneamente varias propiedades recibe el nombre de PLS2.

Una vez establecido el modelo de calibración se puede realizar la predicción de la propiedad modelada en un nuevo conjunto de muestras según la expresión:

$$y_i^T = b_0^T + x_i^T B \quad (14)$$

Siendo  $x_i$  el vector que define la señal analítica de la muestra,  $y_i$  el vector de concentraciones o propiedades a determinar, y  $b_0^T$  el vector que permite realizar

la predicción de una muestra sin necesidad de descomponerla en matrices *scores* y *loadings*.

### 3.3.3. Gráficos PLS. Evaluación de los modelos de predicción PLS.

Una vez formadas las matrices X y Y y calculado el número de variables latentes en el sistema de datos, el siguiente paso consiste en crear los modelos de predicción. Este es un paso que se realiza muy rápidamente cuando se cuenta con las herramientas y conocimientos necesarios. Aunque existen numerosas formas y gráficos para expresar los resultados de los análisis PLS, uno de los métodos más utilizados es mostrar la relación Y-predicha *versus* Y-medida<sup>39</sup>. La Figura 6 representa un gráfico PLS donde se representan los resultados de un modelo de la predicción de tres niveles de concentración de una sustancia analizados con una lengua electrónica. La ventaja de utilizar este tipo de gráficos se manifiesta en cuanto a que a simple vista se puede realizar un examen visual de la capacidad predictiva del modelo creado. Esto es, según la deriva o la distancia de los valores de Y predichos (puntos) sobre los valores de Y de referencia (línea verde), se puede estimar en cuanto a la exactitud y precisión del ajuste. No obstante, se puede realizar una evaluación más rigurosa del modelo, y una de las formas utilizadas consiste en un ajuste lineal de los datos de Y-predichos. Los datos experimentales son ajustados con un modelo simple del tipo  $y = p1*x + p2$ , y entonces a raíz del ajuste se obtienen los parámetros evaluativos p1 y p2, además de tres parámetro adicionales como son: el error cuadrático medio de calibración (RMSEC), de la validación cruzada (RMSECV) y de la predicción (RMSEP). En este sentido, el parámetro p1, que no es más que la pendiente de la línea de ajuste, se

---

<sup>39</sup> R. Labrador, J. Olsson, F. Winqvist, R. Martinez, J. Soto. Determination of bisulfites in wines with an electronic tongue based on pulse voltammetry. 12<sup>th</sup> International Conference on Electroanalysis ESEAC. Prague (2002).



relaciona directamente con la exactitud del modelo, mientras que el valor de RMSEC, RMSECV y RMSEP ofrecerá información acerca de la precisión del modelo.

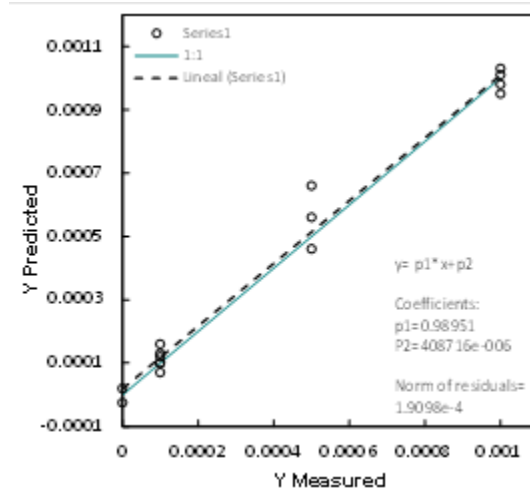


Figura 6. Gráfica de PLS. Valores reales vs. Valores predichos.

Un modelo perfecto sería aquel en el que los puntos de la gráfica predicho frente observado apareciesen alineados sobre la recta de pendiente 1 y de ordenada en el origen 0 (línea verde); es decir, aquel para el que el valor predicho de cada muestra fuese igual a su valor medido u observado. Para modelos reales lo que se observa es una nube de puntos distribuidos a lo largo de la recta de tendencia o regresión (línea punteada). La calidad del modelo puede evaluarse a nivel visual observando:

- El grado de proximidad de los puntos a la recta de tendencia. Si los puntos están muy separados de la recta de tendencia significa que la predicción es mala.
- El grado de similitud que exista entre la recta de tendencia y la recta 1:1. Si los datos están alineados con la recta de tendencia, pero dicha recta está muy separada de la línea 1:1 (ya sea por la pendiente o por la

ordenada en el origen) la predicción también será mala. Pero también puede hacerse una evaluación numérica del modelo atendiendo a los siguientes parámetros:

- $R^2$  o coeficiente de determinación: es el cuadrado del coeficiente de regresión de la recta de tendencia. Indica el grado de proximidad de los puntos de la gráfica a la recta de tendencia.
- La pendiente (A) y la ordenada en el origen (B) de la recta de tendencia: nos indican numéricamente el grado de similitud entre dicha recta de tendencia y la recta 1:1.
- Error cuadrático medio de predicción: nos indica cual es en promedio la diferencia entre los valores predichos y los observados (ver ecuación 15).

$$RMSEP = \frac{\sum_i^M (y_{OBSi} - y_{PREDi})^2}{M} \quad (15)$$

Siendo:

\_  $y_{OBSi}$ : valor del parámetro y observado (conocido) para la muestra  $i$ .

\_  $y_{PREDi}$ : valor del parámetro y predicho para la muestra  $i$ .

\_  $M$ : número de muestras.

### 3.4. Redes Neuronales Artificiales (ANN).

Un método de análisis de las medidas, muy utilizado en los sistemas de lenguas electrónicas son las llamadas redes neuronales artificiales. Estas redes comparan el resultado obtenido del análisis con una base de datos, para así decidir si corresponde con alguna de las clases conocidas o no. Las redes neuronales se

pueden clasificar según si se crean bajo un proceso de supervisión, como las redes Fuzzy Artmap o sin él, como lo son las SOM (self organized maps). Si son redes neuronales supervisadas necesitan una etapa previa de entrenamiento, es decir deberán aprender la relación que existe entre las entradas y salidas y relacionarlas por medio de coeficientes o pesos, para intentar que con muestras similares se obtengan resultados similares.

Una neurona artificial está formada por una serie de  $n$  entradas que actúan de forma ponderada, según un determinado peso ( $W_i$ ), sobre una función de transferencia. El tipo de neurona artificial más común es el **Perceptron**, donde el núcleo de neurona actúa como un sumatorio de las entradas ( $I$ ), ponderadas según su peso ( $W$ ), más una componente de continua o umbral ( $\theta$ ). Es decir:

$$x = \sum_{i=1}^n W_i I_i + \theta \quad (16)$$

Las redes de tipo ARTMAP son una clase de redes neuronales que implementan un aprendizaje supervisado y una posterior clasificación de vectores multidimensionales de entrada en una serie de categorías de salida. Estas redes basan su funcionamiento en la Teoría de la Resonancia Adaptativa (ART) que fue introducida como una teoría que intentaba emular la manera de procesar la información por el cerebro humano.

La red Fuzzy Artmap procede de la red Artmap con las mismas transformaciones que permiten definir la red Fuzzy Art como una generalización a vectores analógicos (con componentes comprendidas entre cero y uno) de la red binaria Artmap. La red Fuzzy Artmap presenta múltiples ventajas que la hacen muy interesante para las aplicaciones con narices electrónicas. De entre todas ellas cabe destacar las siguientes:

- **Aprendizaje rápido.** Las medidas que se presentan en entrenamiento necesitan muy poca carga computacional lo que permite programar el algoritmo en dispositivos programables de bajo coste y aplicar validaciones cruzadas de orden 1 y probar con diferentes combinaciones de parámetros.
- **Aprendizaje con un conjunto reducido de medidas de entrenamiento.** La red presenta una habilidad particular para aprender rápidamente eventos singulares, que aparecen muy pocas veces en el conjunto de entrenamiento. Por lo tanto, en dicho conjunto no es necesario que haya el mismo número de medidas de cada clase para que la red funcione correctamente.
- **Aprendizaje continuo** de nuevas características sin olvidar lo aprendido con anterioridad, algo muy útil para adaptarse a posibles derivas producidas por sensores.

En comparación con otros tipos de redes neuronales, la red Fuzzy Artmap determina automáticamente las neuronas de su capa oculta. Además, maximiza el poder de generalización aprendiendo al 100% el conjunto de entrenamiento. Una vez entrenada, es posible extraer reglas de clasificación a partir de los pesos obtenidos tras el periodo de entrenamiento, lo que puede dar luz sobre los procesos internos y cómo influyen en la categorización de resultados.

#### **4. Tipos de lenguas electrónicas.**

En una lengua electrónica, un array de sensores genera información multidimensional después de la medida de la muestra. La información generada, de naturaleza compleja, tiene que ser procesada de acuerdo con la información química buscada. Como existen varias posibilidades sobre la naturaleza de los

sensores que forman el array, la respuesta mostrada por los diferentes sensores utilizados para el sistema estudiado es de suma importancia; es decir, la aplicación de las lenguas electrónicas, necesitan que los electrodos posean como característica principal una selectividad cruzada, que les permita obtener los aspectos multidimensionales de la información<sup>40</sup>. Las lenguas electrónicas se pueden aplicar de manera cualitativa, en procesos de identificación de especies, clasificación de las variedades de la muestra, etc.; o bien pueden ser aplicadas también en procesos cuantitativos como son la determinación simultánea de un conjunto de especies químicas, un objetivo interesante para procesos de control. Una tendencia diferente, más bioinspirada, es el concepto del *gusto artificial*<sup>40</sup>, diseñado con el objetivo de llevar a cabo la percepción automática del sabor, especialmente en el campo del sector industrial. Esta idea, iniciada por las obras del Prof. Toko en Japón<sup>41</sup>, consiste en desarrollar un conjunto de sensores inspirados en las papilas de la lengua que responden a los tipos básicos de sabor: dulce, agrio, salado y amargo, y umami. El objetivo final es crear sistemas de evaluación análogos a los del gusto humano, que se puedan aplicar en los casos en que un experto humano no es una opción posible, como son el control automático, muestras venenosas, etc.

Si se realiza una búsqueda bibliográfica se realiza con los términos “Lengua electrónica”, se puede observar que el número de artículos ha ido creciendo de forma continua desde los trabajos iniciales fechados en 1997, hasta estabilizarse en los últimos años. El número de artículos en los últimos años, es aproximadamente 40 por año. Una observación adicional, es que casi todos los registros documentados por año corresponden a las familias de la electroquímica, y en menor medida hay ejemplos en los que se emplea sensores ópticos y

---

<sup>40</sup> K. Toko. Taste sensor. Sens. Actuators B: Chem (2000) 64, 205.

<sup>41</sup> K. Toko, Biomimetic Sensor Technology, Cambridge University Press, Cambridge (2000).

sensores gravimétricos como las microbalanzas de cuarzo o los dispositivos de ondas acústicas en superficies. Por último, se puede comentar que, desde el principio, la mayoría de las obras se relacionan con matrices que emplean sensores potenciométricos, mientras que más recientemente, esta variante sólo representa alrededor de la mitad de contribuciones.

Las lenguas electrónicas se pueden clasificar, en función de la naturaleza de la técnica empleada y por tanto de las señales que esta genera, ya sea después de una interacción con el analito, un potencial, o de corriente electroquímica que genera un cambio de resistencia o capacidad como:

- Potenciométricas.
- Voltamétricas.
- Impedimétricas.

Las lenguas electrónicas potenciométricas son aquellas en que la señal se genera por interacción con un analito. Normalmente son arrays de sensores ISE y/o ISFET. Las voltamétricas implican el uso de sensores voltamétricos, que pueden generar la multidimensionalidad de maneras diferentes, por ejemplo, con una serie de electrodos polarizados a diferentes potenciales fijos, o con un barrido de voltametría completo para cada sensor utilizado. Esta variabilidad se encuentra también, en los sensores impedimétricos. Al igual que los voltamétricos, para cada sensor, se puede trabajar a una frecuencia fija, o usar el espectro de frecuencias completo.

#### 4.1. Lenguas electrónicas Potenciométricas.

##### 4.1.1. Principio de medida.

La potenciometría se basa en la medida del potencial que se establece entre dos electrodos cuando son sumergidos en una disolución y no hay circulación de corriente. El potencial medido es la diferencia entre los potenciales que se establecen en cada uno de los electrodos.

$$E = E^{0'} + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \left( \frac{C_0}{C_R} \right) \quad (17)$$

Donde E es el potencial medido,  $E^{0'}$  es el potencial normal, R es la constante de los gases ideales, T la temperatura, F la constante de Faraday, y  $C_0$  la concentración de la especie oxidada y  $C_R$  la concentración de la especie reducida.

En condiciones de corriente nula el potencial de cada electrodo viene dado por la Ecuación de Nernst (Ecuación 18). Por tanto, el potencial externo medido dependerá, entre otras cosas, del material de los electrodos, de la naturaleza y actividad de las especies presentes en la disolución y de la temperatura. De forma que sería posible relacionar el potencial medido con la actividad del soluto en una disolución simple. También resulta interesante destacar que en este caso no existe dependencia directa con la superficie de contacto entre el electrodo y la disolución.

En realidad en potenciometría sólo interesa obtener información sobre uno de los electrodos (electrodo de trabajo o indicador). El otro electrodo sirve únicamente como referencia (contraelectrodo o electrodo de referencia) y, por tanto, debe tener un potencial estable para que no afecte a las medidas del electrodo de

trabajo. Básicamente el electrodo de referencia debe cumplir que su potencial sea estable ante cambios en la concentración del soluto en la disolución.

Con un electrodo de referencia estable, las variaciones en el potencial medido se deberán a cambios en el potencial de la interfaz del electrodo de trabajo que, a su vez, depende de la actividad del soluto. Por tanto, eligiendo el material adecuado para el electrodo de trabajo se puede establecer una relación entre la concentración del soluto y el voltaje medido entre los dos electrodos. En potenciometría existen diversos tipos de electrodos de trabajo:

- electrodos metálicos,
- electrodos selectivos de iones
- y otros.

La Ecuación 18 es válida para el caso de disoluciones simples, pero cuando en la disolución existen varias especies el potencial generado ya no depende de la concentración de una sola especie sino de las interacciones que se producen entre todas ellas<sup>42</sup>; y, por tanto, no resulta posible establecer una relación entre la tensión medida y la concentración de una de las especies. Una posible solución a este problema es el uso de electrodos selectivos de iones (ISE). Sin embargo, la fabricación de electrodos selectivos de iones con bajos coeficientes de selectividad no resulta fácil y dichos coeficientes normalmente dependen de las condiciones de medida. Por este motivo, se empezaron a utilizar electrodos de sensibilidad cruzada en formato de lengua electrónica para la cuantificación de especies dentro de las matrices complejas en las que se producen interferencias entre los distintos compuestos.

---

<sup>42</sup> Y.G. Vlasov, A.V. Legin, A.M. Rudnitskaya. Electronic Tongue: Chemical Sensor Systems for Analysis of Aquatic Media. Russ. J. Gen. Chem. (2008) 78, 2532.



Para el estudio de un caso dado, se puede pensar en un array que incorpore sensores ISE, con membranas adecuadas, teniendo en cuenta la necesidad de respuestas con selectividad cruzada. Se han desarrollado diferentes lenguas electrónicas, para la identificación cualitativa de bebidas y el estudio del envejecimiento de las mismas<sup>29</sup>, basadas en el uso de arrays de electrodos formados por electrodos selectivos con membranas de vidrio o PVC y usando por lo general análisis de PCA. Del mismo modo, se han desarrollado sistemas que permiten la determinación simultánea de los metales en lixiviados de mina, así como los iones presentes en plasma humano<sup>7</sup>.

Las membranas convencionales de PVC pueden ser usadas para formar un array de sensores, si su formulación es la adecuada. Un ejemplo de esto, es la determinación de amonio en el medioambiente, mediante el uso de un ISE formados por membranas de nonactina. Cabe esperar que para este tipo de electrodos los metales alcalinotérreos, principalmente sodio y potasio, actúen como interferentes. La posible interferencia de estos metales se evitó mediante su multideterminación de la especie de interés, amonio y sus interferentes, sodio y potasio, compensando en cada caso la presencia de sus complementarios<sup>43</sup>. El número de sensores que se utilizó fue 8, y la herramienta de procesamiento seleccionada fue un ANN, que tiene como salidas las diferentes concentraciones de las especies buscadas<sup>44</sup>.

---

<sup>43</sup> J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle. Use of an Electronic Tongue Based on All-Solid-State Potentiometric Sensors for the Quantitation of Alkaline Ions. *Electroanal.* (2005) 17, 348.

<sup>44</sup> M. del Valle, in *Electrochemical Sensor Analysis* (Eds: S. Alegret, A. MerkoAi), Elsevier, Amsterdam (2007), p. 721.

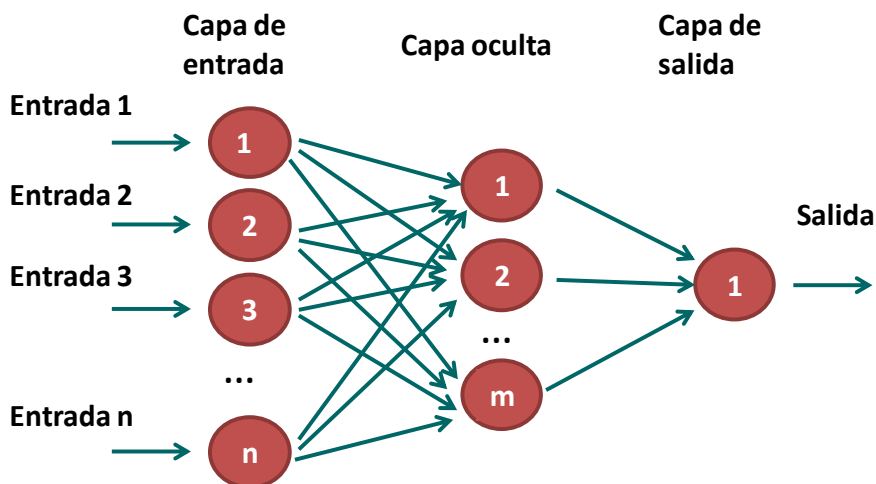


Figura 7. El concepto de lengua electrónica aplicada con multideterminación empleando un modelo de ANN.

La Figura 7 muestra el esquema de ANN utilizado y que más tarde fue aplicado en la monitorización ambiental<sup>45</sup>. De hecho, ya se sabía que la calibración de varios iones en presencia de interferencias podría llevarse a cabo utilizando un diseño experimental y métodos de calibración multivariantes. Como se ha comentado antes, cuando el ISE correspondiente al ion que se quiere determinar (Ion primario) están sujetos a la interferencia, los métodos multivariados permiten la creación de un calibrado que no sería posible por métodos univariados. Esto ha sido demostrado en la determinación simultánea de mezclas de haluro a partir de datos procedentes de una serie de comerciales ISE con aplicación de regresión de componentes principales (PCR) o PLS<sup>46</sup>.

<sup>45</sup> M. Gutiérrez, J. M. Gutiérrez, S. Alegret, L. Leija, P. R. Hernandez, L. Favari, R. Muñoz, M. del Valle. Remote environmental monitoring employing a potentiometric electronic tongue. *Int. J. Env. Anal. Chem.* (2008) 88, 103.

<sup>46</sup> M. Baret, D.L. Massart, P. Fabry, C. Menardo, F. Conesa. Halide ion-selective electrode array calibration. *Talanta* (1999) 50, 541.

Usando un conjunto equivalente de ISE de PVC, formado por nueve formulaciones de membrana diferentes, se planteó para una aplicación cualitativa, en la que diferentes bebidas como aguas, té o jugos de naranja podrían ser clasificados<sup>47</sup>. Un resultado interesante fue que se encontró un amplio rango de variación en la predicción de la cantidad de zumo de naranja natural presente en las bebidas de naranja. Esta propiedad puede ser tomada como un ejemplo del *sensor de software* mencionados anteriormente, dado que se determina una característica compleja, alcanzables con dificultad de los análisis químicos estándar.

En un contexto de uso equivalente de ISE con membranas de PVC, se encuentra el grupo del Profesor Wróblewski en la Universidad de Tecnología de Warsaw (Polonia), que lleva a cabo la condición de sensibilidad cruzada de sus sensores con la preparación de membranas con mezclas de ionóforos, en lugar de la utilización de una membrana convencional de sólo PVC + plastificante + ionóforo. Por ejemplo, suelen utilizar una membrana de cationes selectiva a la valinomicina además de un ionóforo de sodio comercial, o un sensor que responde a una mezcla de aniones y que, al mismo tiempo incorpora un ionóforo de fluoruro y de dihidrogenofosfato<sup>48</sup>. Su sistema sensor se aplica principalmente para la identificación de los diferentes tipos y ciertas marcas de familias de bebidas, tales como leche, cerveza, zumo de naranja o de manzana, agua mineral o tónica, etc. Además, se han probado y compararon extensamente muchos de los procedimientos quimiométricos disponibles, como PCA, PLS, vecino más cercano (KNN) y ANN<sup>11</sup>.

---

<sup>47</sup> J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle. Application of a potentiometric electronic tongue as a classification tool in food analysis. *Talanta* (2005) 66, 1303.

<sup>48</sup> P. Ciosek, E. Augustyniak, W. Wróblewski. Polymeric membrane ion-selective and cross-sensitivity electrodes –based electronic tongue for qualitative analysis of beverage. *Analyst* (2004) 129, 639.

Precisamente comentando las diferentes variantes de sensores empleados en los arrays potenciométricos, hay que decir que para su construcción se han empleado casi todas las tecnologías. En la forma más sencilla de la gama convencional ISE con una solución de referencia interna<sup>8</sup>, o en el uso de configuraciones en estado sólido, las membranas de PVC se depositan en contacto de grafito<sup>49</sup>.

Este concepto ha sido también aplicado sobre soportes en miniatura, derivados de la tecnología de circuitos impresos con tinta de Au<sup>50</sup>, o la integración de varios de ellos en una sola pieza<sup>51</sup>. La integración, que reunió a los diferentes elementos de detección facilita enormemente la manipulación y la miniaturización, que a su vez permite el uso de volúmenes de muestra más reducidos. Una tecnología extensamente investigada para la integración/miniaturización ha sido la elaboración de redes de sensores mediante serigrafía en las membranas de PVC estándar sobre soportes de poliéster<sup>52</sup>. Esta tecnología puede ser dirigida con facilidad a la producción masiva de micro-lenguas electrónicas de bajo coste, con arrays de aproximadamente entre 8 y 10 sensores<sup>53</sup>. Esta tecnología se ha empleado también para preparar un array de sensores con diferentes tintas metálicas serigrafiadas sobre un soporte cerámico, trabajando como electrodos

---

<sup>49</sup> J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, M. De-Roman, L. Leija, P. R. Hernandez, M. del Valle. An electronic tongue using potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the simultaneous quantification of ammonium and potassium ions in water. *Anal. Bioanal. Chem.* (2003) 377, 248

<sup>50</sup> P. Ciosek, W. Wróblewski. W. The recognition of beer with flow-through sensor array based on miniaturized solid-state electrodes. *Talanta* (2006) 69, 1156

<sup>51</sup> P. Ciosek, W. Wróblewski. Miniaturized electronic tongue with an integrated reference microelectrode for the recognition of milk samples. *Talanta* (2008) 76, 548.

<sup>52</sup> L. Lvova, S. S. Kim, A. Legin, Y. Vlasov, J. S. Yang, G. S. Cha, H. Nama. All-solid-state electronic tongue and its application for beverage analysis. *Anal. Chim. Acta* (2002) 468, 303.

<sup>53</sup> M. Gutiérrez, V. M. Moo, S. Alegret, L. Leija, P. R. Hernández, R. Muñoz, M. del Valle. ElectronicTongue for the Determination of Alkaline Ions Using a Screen-Printed Potentiometric Sensor Array. *Microchim. Acta* (2008) 163, 81.

de la primera clase<sup>54</sup>. Cabe destacar las tecnologías de microfabricación, ya sea para preparación de sensores potenciométricos ISE o ISFET en estado sólido. Verrelli et al., prepararon un sistema de lengua electrónica basado en la deposición de membranas de PVC sobre platino contenido en estructuras de silicio microfabricadas<sup>55</sup>. Muy recientemente, Ciosek et al., han preparado un array de sensores combinando la tecnología de *Low Temperature Cofired Ceramic* (LTCC) con la tecnología convencional de membranas de PVC<sup>56</sup>. Aunque potencialmente es una opción viable para el desarrollo de sistemas de lenguas electrónicas, sólo hay un grupo en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona<sup>57</sup> empleando un array de sensores formado por sensores potenciométricos tipo ISFET; que utilizan chips con áreas, encapsulados en un solo dispositivo, donde se depositan membranas de poliuretano foto-curadas sensibles a  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ , lo que da lugar a un dispositivo con 6 canales, después de la incorporación de sensores de pH y redox. El trabajo ha sido aplicado para la identificación de las aguas minerales, y para el análisis de muestras de zumo de uva y de vinos<sup>58</sup>. Más recientemente, una variante adicional de sensor potenciométrico, la Light Addresable Potentiometric Sensor (LAPS) ha sido elaborado en un array y equipado con capas finas con selectividad diferenciada hacia los calcogenuros. Se

---

<sup>54</sup> R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. García-Breijo, L. Gil, J. Ibañez, E. Llobet. An 'electronic tongue' design for the qualitative analysis of natural waters Sens. Actuators B: Chem (2005) 104, 302.

<sup>55</sup> G. Verrelli, L. Francioso, R. Paolesse, P. Siciliano, C. Di Natale, A. D'Amico, A. Logrieco. Development of silicon-based potentiometric sensors: Towards a miniaturized electronic tongue. Sens. Actuators B: Chem (2007) 123, 191.

<sup>56</sup> P. Ciosek, K. Zawadzki, D. Stadnik, P. Bemnowicz, L. Golonka, W. Wróblewski, Microelectrode array fabricated in low temperature cofired ceramic (LTCC) technology. J. Solid State Electrochem. (2009) 13, 129.

<sup>57</sup> L. Moreno, A. Merlos, N. Abramova, C. Jiménez, A. Bratov. Multi-sensor array used as an "electronic tongue" for mineral water analysis. Sens. Actuators B: Chem (2006) 116, 130.

<sup>58</sup> L. Moreno i Codinachs, J.P. Klock, M.J. Schning, A. Baldi, A. Ipatov, A. Bratov, C. Jiménez-Jorquera. Electronic integrated multisensor tongue applied to grape juice and wine analysis. Analyst (2008) 133, 1440.

ha descrito su aplicación para la determinación de metales pesados en materia de medio ambiente<sup>59</sup>.

En nuestro grupo, se han desarrollado diversos ejemplos de lenguas electrónicas potenciométricas. Un ejemplo de ello es el desarrollado por Labrador y colaboradores, en el que 5 electrodos metálicos (Pt, Au, Ag, Cu y Zn), encapsulados en un cilindro de acero inoxidable se utilizaron para la clasificación de aguas residuales y la cuantificación de los aniones bicarbonato, sulfato y cloruros<sup>60</sup>. Además se han empleado electrodos metálicos de Au y Ag para la determinación de la frescura del pescado<sup>61</sup>.

#### **4.2. Lenguas electrónicas Impedimétricas.**

El tercer grupo principal de lenguas electrónicas es el que emplea cambios de impedancia en la señal de partida para la aplicación. En este sentido, de nuevo, se puede utilizar un análisis completo de las distintas frecuencias, o simplemente usar un número valores discretos seleccionados, ya sea de conductividad o capacitancia. En un amplio estudio, Pioggia ha diseñado un array de cinco sensores depositando, sobre el electrodo de estructura microfabricada, diferentes mezclas de nanotubos de carbono dispersados en matrices poliméricas y dopadas con politiofenos. Cada electrodo fue sometido a una frecuencia de 150 Hz para desarrollar una emulación artificial del sabor, mostrando la naturaleza y la estabilidad de la respuesta después

---

<sup>59</sup> W. Hu, H. Cai, J. Fu, P. Wang, G. Yang. Line-scanning LAPS array for measurement of heavy metal ions with micro-lens array based on MEMS. *Sens. Actuators B: Chem* (2008) 129, 397.

<sup>60</sup> R.H. Labrador, J. Soto, R. Martínez-Máñez, L. Gil. An electronic tongue for qualitative and quantitative analyses of anions in natural waters. *J. Appl. Electrochem.* (2009) 39, 2505.

<sup>61</sup> L. Gil, J.M. Barat, E. García-Breijo, J. Ibañez, R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. Llobet, J. Brezmes, M.C. Aristoy, F. Toldrá. Fish freshness analysis using metallic potentiometric electrodes. *Sens Actuators B: Chem* (2008) 131, 362.

de varios meses de uso con disoluciones de cloruro de sodio, ácido cítrico, glucosa y ácido glutámico<sup>62,63</sup>.

El laboratorio más activo en este subtipo de sistemas es el laboratorio de Mattoso y Riul en Sao Carlos/Sao Paulo (Brasil). Este grupo emplea por primera vez una serie de electrodos modificados con películas Langmuir-Blodgett (LB) formados por películas nanoestructuradas de polímeros conductores puros y compuestos, como polianilina y polipirrol. Estos electrodos fueron sometidos a diferentes frecuencias, lo que permitió la detección de cantidades traza de las disoluciones básicas del gusto y los contaminantes inorgánicos en los sistemas líquidos, tal como puede verse en los clústers de PCA<sup>64</sup>. Una aplicación más, relacionada con este trabajo, describe un array formado por películas LB de polímeros conductores y lípidos y películas *layer-by-layer* (LBL) de quitosano depositado en electrodos interdigitados de oro. El sistema se aplicó a la clasificación de los vinos tintos, donde se demostró la posibilidad de identificar la vendimia, los viñedos y las marcas del vino tinto con una formación adecuada de ANN<sup>65</sup>. Recientemente, Olivati et al., han empleado una gran variedad de sensores impedimétricos formados por películas LB de diferentes polímeros conductores y ftalocianinas para detectar trazas de

---

<sup>62</sup> G. Pioggia, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, A. Ahluwalia. A composite sensor array impedentiometric electronic tongue – Part I: Characterization. *Biosens. Bioelectron.* (2007) 22, 2618.

<sup>63</sup> G. Pioggia, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, R. Leardi, A. Ahluwalia. A composite sensor array impedentiometric electronic tongue – Part II: Discrimination of basic tastes *Biosens. Bioelectron.* (2007) 22, 2624.

<sup>64</sup> A. Riul Jr, R. R. Malmegrim, F. J. Fonseca, L. H. C. Mattoso. An artificial taste sensor based on conducting polymers. *Biosens. Bioelectron.* (2003) 18, 1365.

<sup>65</sup> A. Riul Jr, H. C. De Sousa, R. R. Malmegrim, D. S. Dos Santos Jr, A. C. P. L. F. Carvalho, F. J. Fonseca, O. N. Oliveira Jr, L.H.C. Mattoso. Wine classification, by taste sensors made from ultra-thin films and using neural networks. *Sens. Actuators B: Chem* (2004) 98, 77.

compuestos fenólicos y clorofenoles en el agua<sup>66</sup>. Las muestras pueden ser identificadas mediante un análisis de PCA de la señal de capacitancia para una frecuencia de 1 kHz. Los detalles de instrumentación del sistema, también se han descrito recientemente<sup>67</sup>. La variante más interesante es el uso de materiales electropolimerizados<sup>68</sup>, que pueden formar materiales nanoestructurados específicos para las especies a analizar mediante la inserción de dopantes específicos durante la electrólisis<sup>69</sup>.

Por último, en nuestro grupo también se han desarrollado ejemplos de lenguas electrónicas híbridas. Uno de ellos es el dispositivo que combina una lengua electrónica voltamétrica formada por 3 electrodos metálicos (Au, Pt y Ag), con una lengua electrónica impedométrica formada por dos agujas concéntricas. Este dispositivo se utilizó para la determinación del contenido de nitritos, nitratos y cloruros en muestras de carne picada<sup>18</sup>.

#### **4.3. Lenguas electrónicas Voltamétricas.**

El principio de voltametría también se ha aplicado para desarrollar lenguas electrónicas desde sus primeros años. En voltametría se aplica un potencial determinado al electrodo de trabajo y se mide la corriente resultante obtenida

---

<sup>66</sup> C.A. Olivati, A. Riul Jr, D.T. Balogh, O.N. Oliveira Jr, M. Ferreira. Detection of phenolic compounds using impedance spectroscopy measurements. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2009) 32, 41.

<sup>67</sup> F.P.A. Cabral, B. B. Bergamo, C.A.R. Dantas, A. Riul, J. A. Giacometti. Impedance e-tongue instrument for rapid liquid assessment. *Rev. Sci. Instrum.* (2009) 80, 26107.

<sup>68</sup> U. Lange, N. V. Roznyatovskaya, V. M. Mirsky. Conducting polymers in chemical sensors and arrays. *Anal. Chim. Acta* (2008) 614, 1.

<sup>69</sup> E.D. Brugnollo, L.G. Paterno, F.L. Leite, F. J. Fonseca, C.J.L. Constantino, P.A. Antunes, L.H.C. Mattoso. Fabrication and characterization of chemical sensors made from nanostructured films of poly(o-ethoxyaniline) prepared with different doping acids. *Thin Solid Films* (2008) 516, 3274.



cuando las especies redox activas se reducen o se oxidan en la superficie del electrodo.

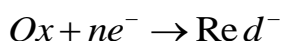
Entre las ventajas que la voltametría ofrece frente a la potenciometría se encuentra la sensibilidad, la versatilidad, la simplicidad y la robustez. En comparación con la potenciometría, la voltametría está menos influenciada por las perturbaciones eléctricas y por lo tanto posee una relación señal/ruido más favorable. Otra de las ventajas de la voltametría es que se pueden emplear diferentes técnicas analíticas como son la voltametría cíclica, de redisolución (stripping voltametría) y de pulsos. El tipo o aspecto de la información obtenida depende del tipo de técnica analítica utilizada.

Normalmente, las especies redox activas se miden a un potencial fijo, pero usando por ejemplo la voltametría de pulsos, las respuestas transitorias debidas a cambios en la Doble Capa de Helmholtz , también ofrecen información relativa a los coeficientes de difusión de especies cargadas.

El uso de diferentes tipos de metales como electrodo de trabajo o el uso de técnicas de redisolución también proporcionan una cantidad de información importante. Hay por tanto un gran número de posibilidades disponible para la obtención de información cuando se utiliza la voltametría.

#### 4.3.1. *Principio de medida*

En voltametría, se aplica un potencial a un electrodo de trabajo. La corriente resultante, debido a la reducción o la oxidación de un analito objetivo es entonces una medida de su concentración. Así, cuando una especie redox activa se reduce en la superficie, la reacción puede ser escrita:



Donde Ox es la forma oxidada y Red<sup>-</sup> es la forma reducida del analito. En condiciones normales, esta reacción redox tiene un potencial normal  $E^0$ . El potencial del electrodo en el equilibrio,  $E_{elec}$  se puede utilizar para establecer una correlación entre la concentración de la especie oxidada ( $C_O$ ) y de la forma reducida ( $C_R$ ) del analito, de acuerdo con la ecuación de Nernst:

$$E_{elec} = E^{0'} + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \left( \frac{C_O}{C_R} \right) \quad (18)$$

Cuando un electrodo metálico es sumergido en una disolución de carácter electrolítico, se producen una serie de procesos interfaciales de carácter electrostáticos y electroquímicos que dan lugar a la formación de la denominada doble capa eléctrica o de Hemholtz.

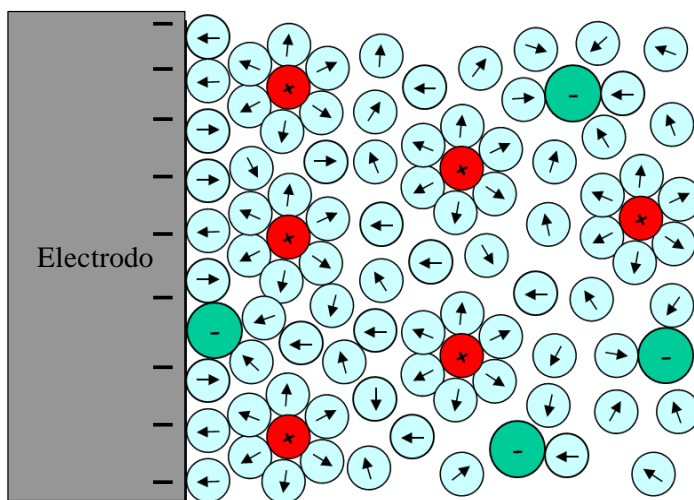


Figura 8. Doble capa eléctrica.

Dicha capa está formada por dos capas de iones adsorbidos sobre la superficie del metal, la Capa Rígida de Hemholtz, formada en ocasiones por un Plano Interno de Hemholtz de aniones específicamente quimisorbidos sobre la superficie del metal, y el Plano Externo de Hemholtz, en el que se ubican una gran cantidad de cationes solvatados contactando directamente con la superficie del metal rica en un exceso de carga negativa <sup>70,71</sup>. La segunda Capa es la denominada Capa Difusa propuesta por Gouy y Chapman, formada por una capa de iones más difusa debido a los efectos de la agitación térmica del sistema. Esta estructura de doble capa es estable siempre que no se aplique entre los electrodos ningún potencial eléctrico que modifique el nivel de Fermi de los mismos.

Así pues, cuando el potencial eléctrico es aplicado, la corriente de carga generada, inicialmente fluiría como una capa que se acumula y que luego decae de manera exponencial hasta alcanzar el nivel de la corriente redox (ver Figura 9). En una aproximación a circuitos integrados, este flujo de corriente, es similar a la carga de un condensador en serie con una resistencia, y se puede expresar de la siguiente forma:

$$i_c = \frac{V_{AB}}{R_s} \cdot e^{\left(\frac{-t}{R_s C_{dl}}\right)} \quad (19)$$

Donde  $R_s$  es la resistencia del circuito equivalente a la resistencia de la disolución,  $E$  es el potencial aplicado,  $t$  es el tiempo y  $C_{dl}$  es un condensador que simula la doble capa eléctrica que se forma alrededor del electrodo, el cual se relaciona con una capacitancia equivalente constante.

---

<sup>70</sup> A.J. Bard, L.R. Faulkner. Electrochemical methods – fundamentals and applications. John Wiley & Sons Inc, New York, USA (1980).

<sup>71</sup> J. Wang. Analytical Electrochemistry. Wiley-VCH, New York, USA (1994).

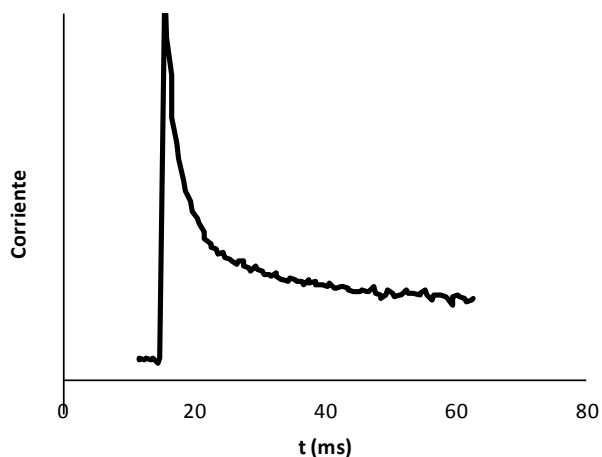


Figura 9. Salto en la señal de la corriente cuando se aplica un pulso de potencial.

La corriente redox,  $i_r$ , obtenida para las especies electroactivas se comporta de una manera similar. Inicialmente, cuando los compuestos que están en las proximidades del electrodo se oxidan o se reducen se genera un gran salto de corriente que decae con el tiempo. La corriente generada para un electrodo plano, sigue la ecuación de Cottrell<sup>72,73,74</sup>:

$$i_r = \frac{nFADC}{(\pi Dt)^{1/2}} \quad (20)$$

<sup>72</sup> P. Ivarsson, S. Holmin, N.E. Höjer, C. Krantz-Rülcker, I. Lundström, F. Winquist. Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied potential modes. *Sens. Actuators B: Chem* (2001) 76, 449.

<sup>73</sup> P. Ivarsson, Y. Kikkawa, F. Winquist, C. Krantz-Rülcker, N.E. Höjer N-E, K. Hayashi, K. Toko, I. Lundström. Comparison of a voltammetric electronic tongue and a lipid membrane taste sensor. *Anal. Chim. Acta* (2001) 449, 59.

<sup>74</sup> C. Krantz-Rülcker, M. Stenberg, F. Winquist, I. Lundström. Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review. *Anal. Chim. Acta* (2001) 426, 226.

Donde A es el área del electrodo de trabajo, D es el constante de difusión y C es la concentración de analito. A una concentración constante, la ecuación se simplifica a:

$$i_r = K \left( \frac{1}{t} \right)^{1/2} \quad (21)$$

Donde K es una constante.

La primera lengua electrónica voltamétrica fue descrita por el Prof. Winqvist en Linköping (Suecia), en 1997<sup>75</sup>, y consistía en un array de sensores formado por dos electrodos de trabajo (Pt y Au), un electrodo auxiliar y un electrodo de referencia. Sobre este sistema de electrodos se aplicó voltametría de pulsos de gran amplitud (LAPV) y de pequeña amplitud (SAPV). En los primeros ensayos se estudiaron muestras de diferentes zumos, leche y tampón fosfato. Los datos obtenidos se analizaron mediante estudios de PCA, mostrando una buena separación entre las muestras. Esta técnica ha seguido desarrollándose para dar lugar a un segundo dispositivo compuesto por cinco electrodos de trabajo (Au, Ir, Pd, Pt, y Rh), un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar de acero inoxidable. La técnica voltamétrica más utilizada en las lenguas electrónicas es la voltametría de pulsos, concretamente LAPV Y SAPV, aunque también se han utilizado voltametría con forma de escalera.

En siguientes investigaciones se realizaron extensos estudios con el fin de optimizar los materiales de los electrodos utilizados en el array de sensores, demostrando cómo los diferentes metales utilizados pueden originar variaciones

---

<sup>75</sup> F. Winqvist, P. Wide, I. Lundström. An electronic tongue based on voltammetry. Anal. Chim. Acta (1997) 357, 21.

en la obtención de la señal de voltametría<sup>76</sup>. De esta manera, la lengua electrónica voltamétrica se convierte en una fuente muy rica de información analítica, dado que la señal original está formada por todos los componentes electro-activos presentes, y al mismo tiempo, por la naturaleza del electrodo de trabajo y por la técnica electroquímica utilizada. Así, se puede postular sistemas que emplean voltametría cíclica, voltametría de barrido lineal, voltametría de pulsos normal (NPV), voltametría de onda cuadrada (SWV), voltametría de pulso diferencia (DPV), etc., incluyendo el uso de las variantes de stripping.

Si la señal analítica necesaria es claramente identificada de antemano, se pueden adoptar diseños instrumentales más sencillos. Por ejemplo, una disposición inteligente fue el uso de una serie de electrodos metálicos, cada de ellos uno polarizado a un potencial fijo, los valores de corriente amperométrica individual registradas como señal de partida, ha sido denominado lengua electrónica amperométrica. Con esta configuración más simple, por lo general compuesta de 1 a 2 electrodos metálicos y de 4 a 5 potenciales por electrodo, genera suficiente información de manera muy rápida (compatible con un sistema de FIA) y con una sencillez elevada, lo que genera un sistema para el seguimiento en el sabor del té, el cual está relacionado con los fenoles (catecoles) y permite su posterior clasificación en función de sus variedades y la evaluación de su astringencia<sup>77</sup>. En los últimos años, se han propuesto mejoras particulares del concepto inicial, por ejemplo, la combinación de tres exploraciones voltamétricas LAPV, realizadas a tres frecuencias (1, 10 y 100 Hz). Un ejemplo de esto fue la discriminación de los

---

<sup>76</sup> S. Holmin, F. Bjcrefors, M. Eriksson, C. Krantz-Ricker, F. Winquist. Investigation of electrode materials as sensors in a voltammetric electronic tongue. *Electroanal.* (2002) 14, 839.

<sup>77</sup> M. Scampicchio, S. Benedetti, B. Brunetti, S. Mannino. Amperometric electronic tongue for evaluation of the tea astringency. *Electroanal.* (2006) 18, 1643.

diferentes licores destilados de acuerdo con su sabor, y de diferentes clases de té verde de acuerdo con la procedencia geográfica<sup>78</sup>.

Un ejemplo desarrollado en Barcelona, combina electrodos metálicos con un electrodo compuesto de epoxi y grafito, y un disco de Ag/AgCl como un pseudo-referencia. Con esta lengua se logró la determinación múltiple de una mezcla de ácido ascórbico, el ácido úrico y paracetamol<sup>79</sup>. La técnica utilizada fue la voltametría de barrido lineal, igual para los tres electrodos, y una ANN como herramienta de quimiométrica para resolver las concentraciones de analito.

Desde un punto de vista conceptual, un sistema de voltametría que emplea un sólo electrodo de alguna manera puede ser considerado como una lengua electrónica, si se asume que el carácter multidimensional de la señal proviene de las corrientes múltiples registradas en un sólo voltagrama. Esto es cierto si el voltamograma contiene información de varios componentes, teniendo en cuenta que el punto dominante será la alta dimensionalidad de la señal de entrada en la etapa de procesamiento de datos. Dependiendo de la técnica electroquímica utilizada, la información puede ser ligeramente diferente, según se aplique la técnica de barrido lineal simple, voltametría cíclica, voltametría de pulsos diferencial, cronoamperometría, etc. En esta variante, algunos de los casos estudiados han conseguido la resolución de compuestos electroactivos, partiendo de una señal voltamétrica superpuesta en el voltagrama.

Por ejemplo, se desarrolló una aplicación ambiental con un electrodo de grafito-resina epoxi, en la que se cuantificaron mezclas de los contaminantes 2-cresol, 4-

---

<sup>78</sup> S.-Y. Tian, S.-P. Deng, Z.-X. Chen. Multifrequency large amplitude pulse voltammetry: A novel electrochemical method for electronic tongue. *Sens. Actuators B: Chem* (2007) 123, 1049.

<sup>79</sup> A. Gutiérrez, D. Calvo, F. Céspedes, M. del Valle. Automatic sequential injection analysis electronic tongue with integrated reference electrode for the determination of ascorbic acid, uric acid and paracetamol. *Microchim. Acta* (2007) 157, 1.

clorofenol y 4-cloro-3-metilfenol por debajo de 1 mM<sup>80</sup>. Bessant hizo una contribución similar con el empleo de un electrodo de Pt, con el que se resolvieron mezclas de glucosa, fructosa y etanol, de nuevo, partiendo del voltamograma de pulso<sup>81</sup>. Este trabajo fue ampliado más tarde con la determinación de cuatro analitos, incluyendo el etanol, el metanol, la fructosa y la glucosa<sup>82</sup>.

Una variante muy prometedora en el trabajo con lenguas electrónicas es el uso de electrodos modificados, como forma de generar señales diferenciadas en el conjunto de sensores. Aparte de utilizar elementos metálicos puros, diversos materiales han sido utilizados para modificar la superficie de los electrodos, entre otros, polímeros conductores o materiales catalíticos, como metaloporfirinas o ftalocianina. En esta línea, un grupo pionero fue el grupo de Rodríguez-Méndez, en Valladolid (España), quien utilizó electrodos convencionales de pasta de carbón convencionales con compuestos derivados de las bis-ftalocianinas de tierras raras, entre ellos los complejos de Lu<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup> y Pr<sup>3+</sup><sup>83</sup>. Este primer conjunto se completó posteriormente con capas de polipirrol electropolimerizadas dopadas con una amplia gama de contraiones y electrodos de pasta de carbono modificados con

---

<sup>80</sup> A. Gutés, A. B. Ibáñez, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle. Simultaneous determination of phenolic compounds by means of an automated voltammetric “electronic tongue”. *Anal. Bioanal. Chem.* (2005) 382, 471.

<sup>81</sup> C. Bessant, S. Saini. , Simultaneous determination of ethanol, fructose and glucose at an unmodified platinum electrode using artificial neural networks. *Anal. Chem.* (1999) 71, 2806.

<sup>82</sup> E. Richards, C. Bessant, S. Saini. Simultaneous quantification of analytes in quaternary mixtures using dual pulse staircase voltammetry and genetically optimised neural networks. *Analyst* (2004) 129, 355.

<sup>83</sup> V. Parra, T. Hernando, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. de Saja. Electrochemical sensor array made from bisphthalocyanine modified carbon Paste electrodes for discrimination of red wines. *Electrochim. Acta* (2004) 49, 5177.



derivados de imidas de perileno<sup>84</sup>. Tradicionalmente, este grupo ha aplicado sus sistemas de lengua electrónica para el sector alimentario, principalmente en el análisis de los vinos y aceites de oliva vírgenes. De alguna manera relacionado con este trabajo, es el de Seeber, en Modena (Italia), que fue el primero en combinar dos electrodos metálicos de Au y Pt con un tercero modificado superficialmente con un polímero conductor, poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT). Esta lengua electrónica voltamétrica se aplicó para discriminar zumos de frutas<sup>85</sup>. Para finalizar esta discusión, cabe comentar una generación de lenguas electrónicas completamente nueva, en las que se utiliza un array de sensores con cuatro electrodos, uno modificado con ácido tióctico, y tres modificados con un péptido corto (3 a 10 aminoácidos). Con ello, se obtienen superficies en las que se han formado complejos metálicos, cuyas propiedades diferenciadas podrían ser utilizadas para resolver una mezcla de metales pesados como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y la mezcla  $\text{Pb}^{2+}$ . Los niveles de concentración alcanzados bajaron de 1 mM, y los cuatro voltagramas de onda cuadrada fueron procesados usando el algoritmo de regresión por mínimos cuadrados parciales no lineales (NPLS)<sup>86</sup>. El uso de sistemas de flujo con lenguas electrónicas también ha sido un acoplamiento con éxito cuando se usan sensores voltamétricos, tanto con técnicas de FIA<sup>62</sup> y como de SIA<sup>64</sup>. El uso de técnicas de flujo ofrece ventajas como, la corrección intrínseca de la deriva del sensor de referencia, la reproducibilidad, la velocidad de operación y automatización. Como antes, las capacidades de automatización

---

<sup>84</sup> V. Parra, Á.A. Arrieta, J.A. Fernández-Escudero, M. Íñiguez, J. A. de Saja, M.L. Rodríguez-Méndez. Monitoring of the ageing of red wines in oak barrels by means of an hybrid electronic tongue. *Anal. Chim. Acta* (2006) 563, 229

<sup>85</sup> V. Martina, K. Ionescu, L. Pigani, F. Terzi, A. Ulrici, C. Zanardi, R. Seeber. Development of an electronic tongue based on a PEDOT-modified voltammetric sensor. *Anal. Bioanal. Chem.* (2007) 387, 2101.

<sup>86</sup> D. Ebrahimi, E. Chow, J. J. Gooding, D. B. Hibbert. Multi-analyte sensing: a chemometrics approach to understanding the merits of electrode arrays versus single electrodes. *The Analyst* (2008) 133, 1090.

pueden ayudar en el procesamiento de gran número de muestras, o también en la desatendida preparación de la gran cantidad de patrones necesarios para desarrollar los modelos de reconocimiento.

#### 4.3.2. *Lenguas electrónicas voltamétricas fabricados con electrodos metálicos planos.*

Un proceso de naturaleza farádica entre un electrodo y las moléculas en disolución, es el resultado de una serie de etapas encadenadas que pueden producirse de forma simultánea o consecutiva, y que incluyen desde un proceso de aproximación inicial de la molécula hacia el electrodo, su posterior transferencia electrónica, hasta el alejamiento de la molécula o ion tras el proceso redox, de la superficie del electrodo.

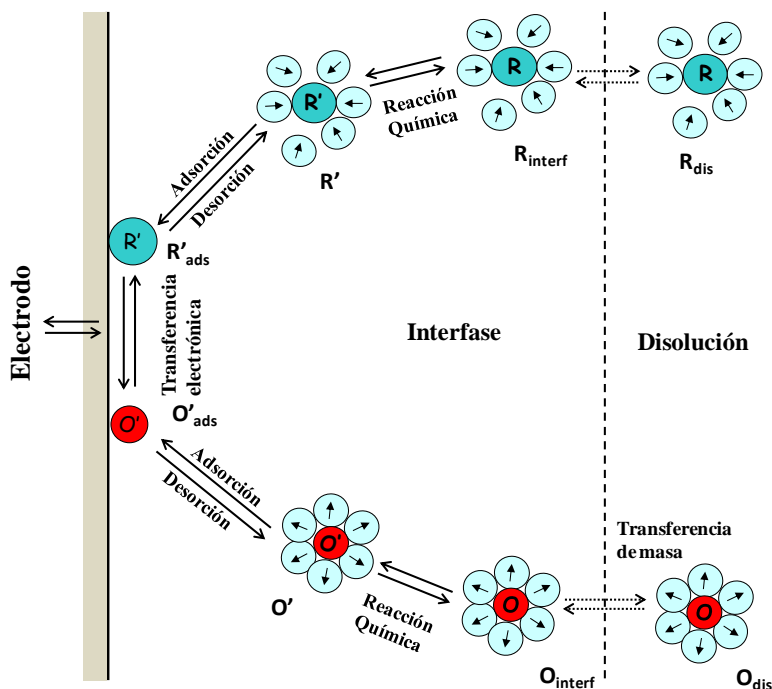


Figura 10. Etapas implicadas en un proceso de naturaleza Farádica.

Tal y como se muestra en la Figura 10, la primera etapa de un proceso electroquímico generalmente supone el transporte de las moléculas desde el seno de la disolución hasta las proximidades del electrodo. Este transporte puede realizarse de mediante cualquiera de los típicos mecanismos de transporte de masas como la convección, migración iónica, la difusión, o cualquier combinación de las mismas.

La segunda etapa consiste en un proceso de adsorción de la molécula sobre la superficie del electrodo, de forma que la molécula acomoda su posición buscando la orientación más favorable sobre el electrodo, para que se produzca la transferencia de electrones por el camino más bajo en energía. En ocasiones, este proceso va precedido de alguna reacción química que favorece la adsorción del producto o de la pérdida de algunas moléculas de solvatación que puedan acompañar a la especie. Una vez adsorbida la molécula se produce la transferencia de electrones que habitualmente es un proceso muy rápido.

El siguiente proceso supone la separación (o desorción) de la molécula de la superficie del metal. Si la molécula obtenida (reducida u oxidada) posee poca estabilidad, esta etapa viene seguida por una reacción química formando nuevos productos más estables. En la última etapa las moléculas formadas se alejan de la zona interfacial mediante procesos de migración, difusión o convección de materia.

Para que la transferencia electrónica se produzca, las especies deben desplazarse desde el seno de la disolución hacia los electrodos mediante diferentes mecanismos: el primero de ellos es el denominado de migración iónica, que es el causado por la existencia de gradientes de campo eléctrico en la disolución, que hace que los iones sufran un desplazamiento cuyo sentido depende del ión y de la carga sobre cada uno de los electrodos con los que actúan. El segundo mecanismo es el denominado de transporte por difusión, que aparece a causa de la presencia

de gradientes de concentración en las inmediaciones del electrodo cuando comienza el proceso de transferencia farádica. El tercer mecanismo es el denominado de convección que es un proceso de transporte de masas a causa de la existencia de gradientes térmicos o que también puede ser motivado por la agitación mecánica efectuada de forma intencionada o accidental sobre el sistema<sup>87</sup>.

En ausencia de agitación mecánica o de vibración y en el caso concreto en que la intensidad de corriente que circula a través del sistema sea muy baja, como en la voltametría de pulsos, donde no se produce un calentamiento apreciable por efecto Joule, el transporte por convección puede considerarse despreciable y por tanto se puede suponer que los procesos de transporte de materia están controlados solamente por migración y difusión.

#### *4.3.2.1. Procesos con reacciones químicas previas a la transferencia electrónica.*

La etapa que sigue al transporte de materia hacia la superficie del electrodo, es la adsorción sobre el electrodo. En muchas ocasiones, previa a la adsorción sobre el electrodo se producen reacciones químicas que favorecen que los productos formados se adsorban de acuerdo con una energía y una disposición más adecuada para que se produzca la transferencia de electrones. Este tipo de procesos son denominados CE, es decir, procesos de reacción química previa (C) a la transferencia de electrones (E).

Los ácidos carboxilos son un ejemplo de este tipo de procesos, ya que previo a la reducción del ión hidronio que contiene el ácido carboxílico se produce la desprotonación de la molécula. Dicha desprotonación se ve más o menos dificultada en función de pKa del ácido, de forma que la reducción está

---

<sup>87</sup> J. O'M Bockris, A.K.N. Reddy. Modern Electrochemistry. New York: Plenum Press, 1998.

claramente afectada por ese factor termodinámico. Este hecho se manifiesta tanto en cambio de potencial como de intensidad de transferencia<sup>88,89</sup>.

#### 4.3.2.2. *Reactividad de los metales nobles.*

Se ha estudiado el efecto de la presencia de sustancias orgánicas capaces de quimisorberse sobre la superficie de metales nobles como el Rh, Ir, Pd, Pt y Au sobre su comportamiento electroquímico en disolución. Estos metales nobles se caracterizan por formar capas de óxido de carácter pasivante, cuando se someten a un potencial y a un pH determinado<sup>90</sup>. Electrodo de platino han sido utilizados para estudiar la adsorción, la orientación, el modo y el tipo de enlace de una amplia serie de compuestos aromáticos y quinonoideos así como los procesos electrocatalíticos inducidos por el paso de corriente<sup>91,92</sup>. Un resultado de este trabajo muestra que la velocidad de adsorción es relativamente alta, así por ejemplo, la situación del equilibrio de adsorción de la hidroxiquinona sobre un electrodo de platino policristalino, plano y pulido, se alcanza en menos de un minuto.

---

<sup>88</sup> A. Survila, S. Kanapeckaitė, J. Pileckienė, and J. Budienė. Kinetics of hydrogen evolution on copper electrode involving organic acids as proton donors. *Int. J. Electrochemistry* (2011) 2011, 1.

<sup>89</sup> A. Benito, J.M. Lloris, R. Martínez-Máñez, J Soto. Switching and tuning processes in the interaction of proton with ferrocenyl amines. *Polyhedron* (1998) 17, 491.

<sup>90</sup> M. J. N. Pourbaix, J. Van Muylder and N. de Zoubov. Electrochemical properties of the platinum metals. *Platinum Metals Rev.* (1959) 3, 100.

<sup>91</sup> M. P. Soriaga, E. Binamira-Soriaga, A. T. Hubbard, J. B. Benzinger, K.W. Peter Pang. Surface coordination chemistry of platinum studied by thin-layer electrodes. Adsorption, Orientation, and Mode of Binding of Aromatic and Quinonoid Compounds. *Inorg. Chem.* (1985) 24, 65.

<sup>92</sup> M. P. Soriaga, J. H. White, D. Song, V. K. F. Chia, P. O. Arrhenius, A. T. Hubbard. Surface coordination chemistry of platinum studied by thin-layer electrodes. Surface chemical reactivity of aromatic and quinonoid compounds adsorbed in specific orientational states". *Inorg. Chem.* (1985) 24, 73.

En un estudio más reciente, se muestra que la presencia de alquenos, alquinos, aromáticos, aromáticos heterocíclicos, alcoholes, fenoles, sulfuros, aminas, amidas, nitrilos, aldehídos, compuestos carboxílicos, CO, esterres entre otros, producen modificaciones apreciables en el potencial de oxidación del metal así como en la intensidad de corriente<sup>93</sup>, en ese mismo trabajo se propone que las constantes de quimisorción para un determinado metal noble, disminuyen según el sentido:

*Mercaptanos aromáticos > Aromáticos-N > Anillo Aromático > Alquinos > Alquenos > R<sub>2</sub>S > Arilcianuros > N-Alifático > Alcoholes > Alquilcianuros > Ácidos Carboxílicos > Ésteres > Alcanos*

Además se proponen que para un mismo grupo funcional, un aumento de peso molecular del adsorbato disminuye la velocidad de corrosión metálica. Por otra parte, se propone que para un determinado grupo funcional, se observa generalmente que la fuerza de adsorción depende del material del electrodo, así que se propone el orden:



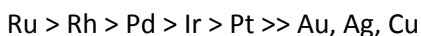
Los procesos de fisiorción y quimisorción también se manifiestan sobre los electrodos nobles de forma importante con sustancias de carácter iónico, así por

---

<sup>93</sup> S.L. Michelhaugh, C. Bhardwaj, G.J. Cali, B.G. Bravo, M.E. Bothwell, G.M. Berry, M.P. Soriaga. The influence of chemisorbed organic monolayers on electrode surface oxidation. Corrosion (1991) 47, 322.

ejemplo existe una gran cantidad de estudios sistemáticos dedicados al estudio de la adsorción superficial de aniones sulfato, carbonato, fosfato, haluros, etc.<sup>94, 95</sup>.

También ha sido estudiada la oxidación electroquímica del amoníaco sobre diferentes electrodos nobles y con algunos metales de transición, así como el papel jugado por la adsorción sobre este proceso electroquímico<sup>96</sup>. En este trabajo se demuestra que el potencial de oxidación del amonio depende del metal utilizado y se establece que para esta especie, la constante de adsorción sigue el orden:



Es interesante observar que este orden no es el mismo que siguen los metales con sistemas de carácter orgánico o aromático. Por otra parte, el oro, la plata y el cobre no parecen adsorber significativamente el amoníaco, sino sólo cuando una capa de óxido de metal es formada previamente.

Los productos formados en este proceso oxidativo, son el nitrógeno que aparece cuando la superficie metálica no está oxidada, lo que está de acuerdo con resultados obtenidos anteriormente<sup>97</sup>, mientras que se obtienen diferentes óxidos de nitrógeno, como  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ , si se ha formado previamente una capa de óxido en la superficie del metal.

---

<sup>94</sup> Kazuki Arihara, Fusao Kitamura, Takeo Ohsaka, Koichi Tokuda. Characterization of the adsorption state of carbonate ions at the Au(III) electrode surface using in situ IRAS. *J. Electroanal. Chem.* (2001) 510, 128.

<sup>95</sup> I. R. Moraes, F. C. Nart. Vibrational study of adsorbed phosphate ions on rhodium single crystal electrodes. *J. Electroanal. Chem.* (2004) 563, 41.

<sup>96</sup> A.C.A. de Vooys, M.T.M. Koper, R.A. van Santen, J.A.R. van Veen. The role of adsorbates in the electrochemical oxidation of ammonia on noble and transition metal electrode. *J. Electroanal. Chem.* (2001) 506, 127.

<sup>97</sup> H. Gerischer, A. Mauerer. Untersuchungen zur anodischen oxidation von ammoniak an platin-elektroden. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochemistry* (1970) 25, 421.

#### 4.3.2.3. *Reactividad de los metales no nobles.*

Como sugieren los resultados realizados con algunos metales nobles, en ocasiones oxidar el electrodo de trabajo puede ser conveniente. Esto resulta más evidente cuando se trabaja con electrodos no nobles, porque es sabido que en muchas ocasiones se producen reacciones espontáneas de formación de precipitados, de complejos entre el catión generado por la oxidación del metal del electrodo y alguna de las especies presentes en disolución, sea iónica o neutra, e incluso de naturaleza catalítica. Como consecuencia de esa reacción química, se comprueba que el potencial de corrosión del electrodo metálico, disminuye o que para un determinado potencial constante, el resultado es que la intensidad de corriente aumenta de forma significativa.

La voltametría cíclica realizada con este tipo de electrodos muestra la aparición de nuevos picos u ondas que en ocasiones sufren un progresivo desplazamiento del potencial de oxidación o reducción cuando el metal se encuentra en presencia de distintas especies químicas y a distintas concentraciones.

Los electrodos de metales no nobles han sido utilizados ocasionalmente para la detección de especies química en disolución, por ejemplo ha sido demostrada experimentalmente la capacidad de los electrodos de cobre y níquel para la detección de aminoácidos y péptidos<sup>98</sup> y la del cobre para la detección y cuantificación de herbicidas como el glifosato<sup>99</sup>. Una de las explicaciones propuestas para justificar la capacidad de estos electrodos para la detección de algunos tipos específicos de compuestos, ha sido que las especies generadas por

---

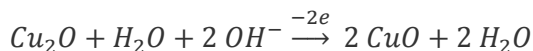
<sup>98</sup> P. Luo, F. Zhang, R.P. Baldwin. Constant potential amperometric detection of underivatized amino acids and peptides at a copper electrode. *Anal. Chem.* (1991) 63, 1702.

<sup>99</sup> C.F.B. Coutinho, M.O. Silva, M.L. Calegaro, S.A.S. Machado, L.H. Mazo. Investigation of Copper dissolution in the presence of glyphosate using hydrodynamic voltammetry and chronoamperometry. *Solid State Ion.* (2007) 178, 161.



la oxidación del metal  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{3+}$  o sus óxidos o hidróxidos, reaccionan con la especie disuelta modificando de esta manera la velocidad de corrosión del metal. Para el caso del glifosato se ha comprobado que forma complejos muy estables con el cobre (II)<sup>100</sup>, mientras que por ejemplo, electrodos modificados con hidróxido de níquel han sido utilizados con éxito en la detección amperométrica de carbohidratos en disolución<sup>101</sup>.

Recientes trabajos muestran el potencial y la reproducibilidad que presenta el electrodo de cobre en la determinación de la Demanda Electroquímica de Oxígeno (DEO) en aguas naturales y residuales de distinta procedencia<sup>102, 103</sup>. Los estudios realizados muestran que la DEO correlaciona muy bien con la Demanda Química de Oxígeno (DQO), y sugiere que la medida electroquímica pueda ser una buena y barata alternativa al control de la DQO. La alta reproducibilidad utilizando este electrodo se ha justificado en base a la siguiente secuencia de reacciones:

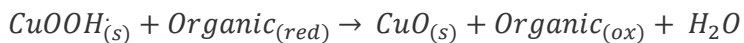
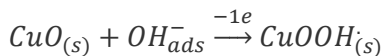


<sup>100</sup> P.G. Daniele, C. De Stefano, E. Prenesti, S. Sammartano. Copper (II) complexes of N-(phosphonomethyl)glycine in aqueous solution: a thermodynamic and spectrophotometric study. *Talanta* (1997) 45, 425.

<sup>101</sup> M. Vidotti, C. D. Cerri, R. F. Carvalhal, J. C. Dias, R. K. Mendes, S. I. Córdoba de Torres, L. T. Kubota. Nickel hydroxide electrodes as amperometric detectors for carbohydrates in flow injection analysis and liquid chromatography. *J. Electroanal. Chem.* (2009) 636, 18.

<sup>102</sup> C. R. Silva, C. D. C. Conceição, V.G. Bonifácio, O.F. Filho, M. F. S. Teixeira. Determination of the chemical oxygen demand (COD) using a copper electrode: a clean alternative method. *J. Solid State Electrochem.* (2009) 13, 665.

<sup>103</sup> K.H. Lee, T. Ishikawa, S.J. McNiven, Y. Nomura, A. Hiratsuka, S. Sasaki, Y. Arikawa, I. Karube. Evaluation of chemical oxygen demand (COD) based on coulometric determination of electrochemical oxygen demand (EOD) using a surface oxidized copper electrode. *Anal. Chim. Acta* (1999) 398, 161.



Este último proceso es electrocatalítico y puede continuar hasta transformar al compuesto orgánico en dióxido de carbono.

Las aplicaciones del electrodo de cobre en la zona de reducción son también muy interesantes, se ha demostrado que el cobre cataliza la reducción electroquímica nitrato a nitrito y de esta segunda especie hasta amoníaco si el proceso de electrólisis se deja avanzar<sup>104</sup>.

---

<sup>104</sup> K.Bouzek, M.Paidar, A. Sadilkova, H. Bergmann. Electrochemical reduction of Nitrate in weakly alkaline solutions. J. Appl. Electrochem. (2001) 31, 1185.

## **Objetivos**



## Objetivos

En la Introducción de la presente memoria se ha realizado una presentación del concepto de lengua electrónica, con mayor detalle de las lenguas electrónicas voltamétricas con el fin de obtener una información global de las características de la muestra a analizar. Para lograr obtener conclusiones de los datos obtenidos en las medidas con sensores se aplican técnicas de análisis multivariante que quedan englobados en la disciplina de la quimiometría.

Partiendo de los criterios que han sido marcados en el apartado anterior se ha desarrollado la presente tesis doctoral con los siguientes objetivos:

1. Definir las prestaciones de los equipos para realizar las medidas voltamétricas de una forma rápida, sencilla y fácil de usar. En este sentido se han fijado parámetros como el número de pulsos, la duración y la amplitud de los mismos, las escalas de corrientes necesarias y la posibilidad de medir a dos o a tres electrodos. Además, también se ha determinado la forma en la adquisición de los datos obtenidos facilitando su posterior análisis mediante técnicas de análisis multivariante. En este sentido, se definieron herramientas como: filtrado, comprensión, selección y organización de dichas señales. Una vez establecidas las prestaciones necesarias, personal especializado en ingeniería electrónica desarrollaron dos prototipos empleados en la presente tesis.

2. Búsqueda de un método sistemático para el diseño de pulsos para las lenguas electrónicas voltamétricas.

3. Aplicación de los sistemas de medida desarrollados en algunos de los campos de aplicación más importantes de las lenguas electrónicas, como son:

- 3.1. Seguridad.

El objetivo a desarrollar en este campo, es estudiar la viabilidad de la lengua electrónica para la detección de simulantes de agentes nerviosos como son el DCP

y del DCNP, de entre un conjunto de posibles interferentes y su posterior cuantificación.

3.2. Industria alimentaria.

3.2.1. Determinación de agentes de salado como los cloruros, nitratos y nitritos en carne picada.

3.2.2. Monitorización de la maduración de la uva y del proceso de fermentación del mosto.

3.3. Control Medioambiental.

El objetivo en este campo es la aplicación de la lengua electrónica para el seguimiento de la calidad de las aguas residuales mediante el control de los parámetros: DQO, DBO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , Acidez Volátil (HAC) y Alcalinidad.

## **Capítulo 1:**

# **La lengua electrónica y los equipos de medida.**





### **1.1. La lengua electrónica.**

El dispositivo de lengua electrónica es un sistema de sensores compuesto por ocho electrodos de trabajo Pt, Rh, Ir, Au, Ag, Cu, Co y Ni encapsulados en dos cilindros de acero inoxidable con cuatro electrodos cada uno. De esta forma, en uno de ellos se instalaron cuatro varillas de metales nobles: Au, Pt, Ir, Rh que y en el otro cilindro otras cuatro varillas de metales no nobles: Ag, Cu, Ni y Co. Los electrodo tienen una longitud de 2.5 cm, 1 mm de diámetro con una pureza del 99.9% y que se encapsulan cilindros de acero inoxidable con una longitud de 10 cm mediante una resina epoxi. El cilindro sirve, al mismo tiempo, como cuerpo de la lengua electrónica y como contraelectrodo. En la figura 1.1 se muestra el aspecto de uno de los cilindros con cuatro electrodos en su interior.

Tal y como se describe en la bibliografía, la mayoría de los sistemas de lengua electrónica voltamétrica emplean metales nobles como el rodio o el iridio e incluso la plata o el acero inoxidable. Dichos metales forman monocapas de óxidos que adsorben compuestos orgánicos. En la presente tesis se han incluido los metales no nobles, como el cobalto, el cobre y el níquel con el fin de obtener un comportamiento electroquímico más variado. Esta variabilidad se obtiene gracias a la reactividad de los iones metálicos que se generan después de la oxidación del electrodo con las especies disueltas que pueden reaccionar con ellos para formar precipitados o especies complejas. En la página siguiente se muestra el aspecto de uno de los cilindros con cuatro electrodos en su interior.



Figura 1.1. Electrodo formado por diferentes metales encapsulados.

#### **1.1.1. Uso y limpieza de los electrodos.**

Los sistemas de medida basados en electrodos metálicos tienen como ventaja que no requieren sistemas costosos ni complicados de mantenimiento o limpieza, y los electrodos se conservan limpios con un simple pulido de su superficie, evitando así problemas de suciedad y de falta de reproducibilidad. En este trabajo, antes de su uso, la superficie del electrodo fue preparada por pulido mecánico con un papel de lija esmeril, y enjuagada con agua destilada. En un segundo paso, la lengua se pule en una almohadilla de fieltro con alúmina que posee un tamaño de partícula de  $0.05\ \mu\text{m}$  y se lava con agua destilada para ser de nuevo pulidas en una almohadilla de nylon con diamante que poseía un tamaño de partícula de 15, 3 y  $1\ \mu\text{m}$ , para producir en la superficie del electrodo una superficie lisa y especular. Más adelante en el desarrollo de la serie de medidas sólo se aplicó un pulido sencillo con polvo de diamante.

## **1.2. Propuestas de desarrollo de nuevos equipos de medida.**

Las aplicaciones de los sistemas de lenguas electrónicas suelen centrarse en medidas más bien de tipo cualitativo que cuantitativa, para realizar experiencias en campo y poder lograr la discriminación de muestras complejas de una forma rápida y sencilla. Por ello es conveniente contar con equipos de medida que sean portátiles y de fácil manejo. Para lograr estos objetivos el equipo de medida Autolab PGSTAT100 no es precisamente el más adecuado porque es un sistema de precisión concebido para trabajos de investigación en laboratorio, de gran costo económico y lento y complejo de utilizar. Por ello se pensó en el desarrollo de nuevos equipos de medida que permitan realizar experiencias según las características de las lenguas electrónicas.

Por lo que se propuso el desarrollo y construcción de nuevos equipos de medida electroquímica contruidos a medida de las necesidades y requerimientos del grupo de investigación electroquímica del instituto IDM de la UPV.

### **1.2.1. Primer prototipo de medida**

A la hora de desarrollar y construir un equipo de medida voltamétrica se consideró que debía cumplir los siguientes requisitos y propiedades:

- Sistema económico, con un diseño adaptado para lograr operatividad con el menor coste posible.
- Sistema portátil, cuyas reducidas dimensiones permitan realizar medidas in situ.
- Sistema de manejo sencillo y de fácil acceso para el usuario, que no requiera personal cualificado y proporcione un rápido y cómodo análisis de las medidas realizadas.
- Sistema fiable, que posea la precisión y exactitud necesarias para obtener una medida de calidad y confianza.

- Sistema flexible, apto para admitir diversas técnicas electroquímicas, como potenciometría, voltametría y espectroscopía de impedancia.

Para realizar los nuevos equipos se contó con la colaboración del grupo de Microelectrónica Híbrida del mismo Centro de Investigación IDM. Este grupo está formado básicamente por profesores y técnicos de ingeniería electrónica con amplia experiencia en el desarrollo de equipos electrónicos avanzados<sup>105</sup>. El equipo fue concebido en principio para realizar medidas de espectroscopía de impedancia pero también permite realizar otros tipos de medidas electroquímicas como la voltametría de pulsos, que fue la utilizada para realizar parte de las experiencias de esta tesis doctoral.

Las características técnicas del sistema de medida fueron:

- Dos canales de muestreo simultáneos para la medida de la tensión aplicada y de la corriente obtenida. No tiene potencióstato
- Frecuencia de la señal generada desde 1Hz hasta 1MHz.
- Amplitud variable de las señales. Tensión máxima 1Vpp con un offset de 0V.
- Cuatro rangos de corriente de salida configurables. Valores: 10mA, 1mA, 100  $\mu$ A y 10  $\mu$ A.

---

<sup>105</sup> Rafael Masot. Tesis doctoral: Desarrollo de un sistema de medida basado en espectroscopía de impedancia para la determinación de parámetros fisicoquímicos en alimentos. UPV (2010).

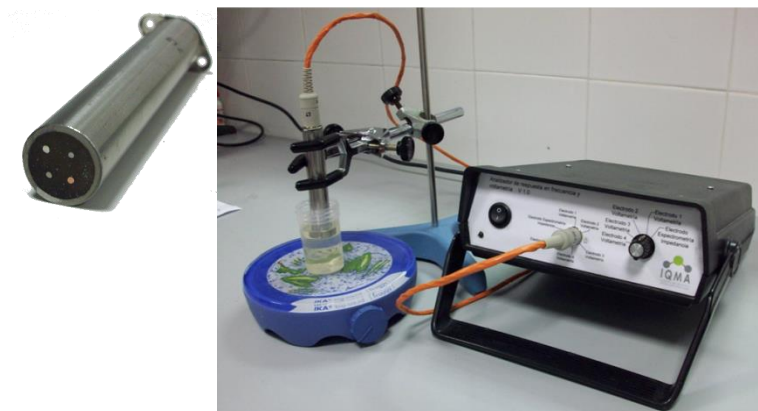


Figura 1.2. Primer prototipo de medida desarrollado por el IDM.

El equipo de medida está formado por tres bloques: electrodos, equipo electrónico y el programa informático para poder realizar las medidas por medio de un ordenador (Figura 1.2).

#### 1.2.1.1. Componentes electrónicos.

El equipo electrónico está formado por un sistema complejo compuesto de varios bloques, que se pueden resumir en los siguientes:

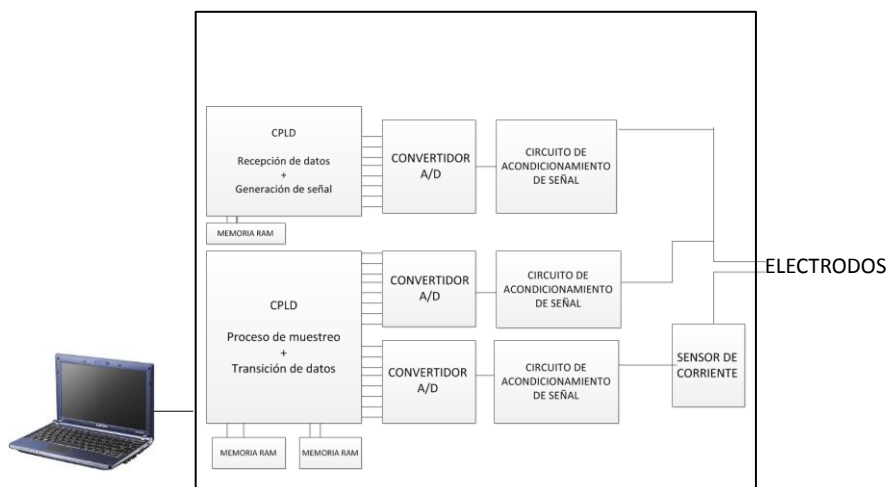


Figura 1.3. Esquema de bloques del primer prototipo de medida desarrollado en el IDM.

1. Captura de Señal. Está formado por sistema sencillo a dos hilos que se introducen en la muestra a analizar. El sistema electrónico aplica una señal eléctrica en forma de tensión variable en el tiempo (voltimetría de pulsos). Esta tensión genera una señal corriente eléctrica que hay que medir. La medición de la corriente se realiza por medio de un convertidor corriente–tensión configurado en puente autobalanceado para reducir los efectos capacitivos de las altas frecuencias sobre la medida
2. Acondicionamiento de la señal analógica. Cambia las características eléctricas de la pequeña señal obtenida por el potencióstato a las características del bloque siguiente (convertor A/D). La tarea fundamental es amplificación de la señal y desplazamiento de nivel.
3. Convertidor Analógico-Digital (A/D). Transforma la señal analógica, que es continua, en una señal digital, es decir formado por una combinación de números binarios. Los convertidores utilizados son de 8 bits, con lo cual permite realizar las medidas con una precisión de  $2^8$ .
4. Convertidor Digital-Analógico (D/A). Realiza el proceso contrario al convertidor A/D, es decir convierte una señal digital en analógica. Los convertidores utilizados son de 10 bits. En nuestro caso sirve para la generación de la señal voltamétrica desde una combinación binaria a los pulsos de tensión de amplitud variable
5. CPLD. Es un dispositivo digital programable complejo (*Complex Programmable Logic Device*) de la familia MAX7000S de Altera. Este tipo de dispositivo está formado por un gran conjunto de elementos digitales unidos entre sí por medio de líneas de conexión que lo puede configurar el usuario. Por medio de un software específico de la empresa fabricante del dispositivo se realiza la programación para que permita realizar las tareas asignadas. El sistema posee dos dispositivos CPLD, uno realiza las

tareas del proceso de muestro de la señal y la transmisión de datos y la segunda la recepción de datos y la generación de señal. Además, el equipo precisa de diversas memorias RAM de 2kB para el almacenamiento de datos.

#### *1.2.1.2. Limitaciones del prototipo.*

Este equipo fue concebido fundamentalmente para realizar medidas de impedancia espectroscópica<sup>106</sup> y posteriormente se realizaron modificaciones para realizar voltametría cíclica y de pulsos. Aunque fue útil para estas aplicaciones también se observaron una serie de limitaciones:

Como las medidas se realizaban a dos hilos implicaba que las medidas variaban mucho en función de las condiciones de ensayo puesto que no se disponía de un electrodo de referencia.

El rango de tensión de salida para el que se había fabricado el equipo [-0.5V; +0.5V] era demasiado bajo para algunos ensayos de voltametría de pulsos.

#### **1.2.2. Segundo prototipo de medida.**

El segundo equipo de medida se desarrolló para mejorar algunas de las características técnicas del primer equipo de medida<sup>107</sup>. El equipo debía contar con las mismas especificaciones generales que el primer equipo de medida. Es decir, el sistema debía ser flexible, para permitir la implementación tanto de

---

<sup>106</sup> Rafael Masot et al. Design of a low-cost non-destructive system for punctual measurements of salt levels in food products using impedance spectroscopy. *Sensors and Actuators A: Phys.* (2010) 158 217.

<sup>107</sup> M. Alcañiz. Tesis doctoral: Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el ámbito agroalimentaria. UPV (2011).

espectroscopía de impedancias como de voltametría cíclica y de pulsos, sistema portátil, de fácil manejo para el usuario, fiable y económico,

Además, en este caso, el sistema estaba dotado de aplicación software que almacene de los datos recogidos y que proporcione herramientas que permitan un rápido y cómodo análisis de las medidas realizadas.

Para ello contaba con las siguientes especificaciones técnicas:

1. Voltametría cíclica:

1.1. Generación de señales triangulares configurables. Se pueden configurar los valores de la tensión inicial, la tensión de pico máxima y la tensión de pico mínima. Dichas tensiones toman valores entre -2V y 2V. Asimismo se puede configurar la velocidad de barrido con valores comprendidos entre 2mV/s y 10V/s.

1.2. Muestreo de la señal de tensión aplicada al electrodo de trabajo y de la señal de corriente que circula por el mismo.

1.3. Representación de la curva  $i$  vs  $E$  (voltaograma).

1.4. Almacenamiento de los datos de tensión y corriente.

2. Voltametría de pulsos:

2.1. Generación de un tren de hasta 50 pulsos cuya amplitud es configurable en el rango de -2V hasta +2V. La duración de los pulsos es configurable con valores comprendidos entre 1ms y 800 ms.

2.2. Muestreo de la señal de tensión aplicada al electrodo de trabajo y de la señal de corriente que circula por el mismo.

2.3. Representación gráfica de la evolución temporal de las señales de tensión y corriente muestreadas.



## 2.4. Almacenamiento de la evolución temporal de la señal de corriente muestreada.

Las características técnicas del sistema de medida fueron:

- Posibilidad de trabajar a 2 electrodos (contraelectrodo y electrodo de trabajo) o a 3 electrodos (contraelectrodo, electrodo de referencia y electrodo de trabajo).
- Posibilidad de realizar medidas en hasta 10 electrodos de trabajo multiplexados.
- Hasta 32 escalas de corriente (desde 10  $\mu\text{A}$  hasta 20 mA).
- Hasta 9 niveles de estabilización del potencióstato.

El equipo de medida está formado por tres bloques: electrodos, equipo electrónico y el programa informático para poder realizar las medidas por medio de un ordenador (Figura 1.4).



Figura1.4. Segundo prototipo de medida desarrollado en el IDM.

### 1.2.2.1. Componentes electrónicos.

El equipo electrónico está formado por un sistema complejo que está compuesto por varios bloques (Figura 1.5), que se pueden resumir en los siguientes:

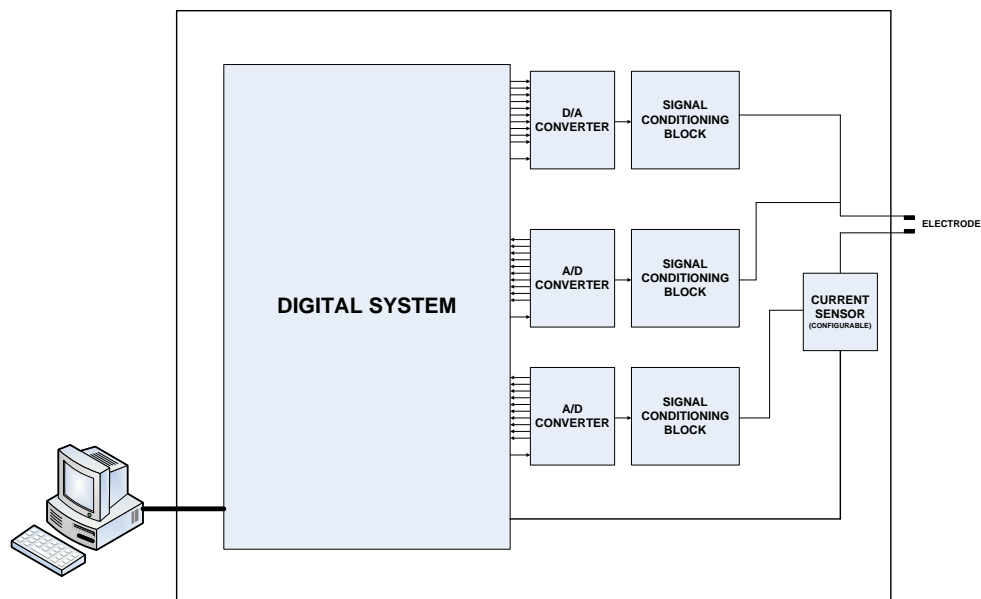


Figura 1.5. Esquema de bloques del segundo prototipo desarrollado en el IDM.

1. Potenciostato: que permite la captura de la señal voltamétrica y la conversión de corriente a tensión eléctrica. El potenciostato puede trabajar en configuración de dos o tres electrodos. Para la técnica de voltametría de pulsos se pueden utilizar un máximo de diez electrodos de trabajo (WE1 a WE10)
2. Acondicionamiento de la señal analógica: Cambia las características eléctricas de la pequeña señal obtenida por el potenciostato a las

características del bloque siguiente (convertor A/D). La tarea fundamental es amplificación de la señal y desplazamiento de nivel.

3. Convertidor Analógico-Digital (A/D). Transforma la señal analógica, que es continua, en una señal digital, es decir formado por una combinación de números binarios. Los convertidores utilizados son de 12 bits.

4. Microcontrolador. Es el bloque encargado de realizar todas las tareas de control del equipo de medida. El microcontrolador es un dispositivo electrónico digital programable del modelo PIC24FJ256 que trabaja con datos en paralelo de 16 bits. Este tipo de dispositivos poseen una memoria donde se almacena un programa informático (oculto para el usuario final) que controla al resto de bloques del sistema.

5. Convertidor Serie-Paralelo. El microcontrolador trabaja con datos en paralelo, es decir varios bits (1 y 0) al mismo tiempo, pero la transmisión de la información al ordenador se realiza a través de un único cable que exige la comunicación serie, es decir un bit detrás de otro. Por lo tanto este dispositivo convierte los datos en paralelo a serie.

#### *1.2.2.2. Software de la aplicación.*

Para poder trabajar con el equipo de medida se precisa un ordenador personal (PC) y una aplicación informática que convierte la señal eléctrica procedente del equipo electrónico en datos que se almacenen en memoria para su posterior análisis y en trazas que se visualicen en pantalla.

Para lograr estas tareas se ha desarrollado un programa de aplicación por medio de lenguaje de programación de alto nivel Visual Basic 6.0. Con este programa se obtiene un interface gráfica GUI (*Graphic User Interface*) para controlar y monitorizar el procedimiento en pantalla de ordenador. Para voltimetría de pulso se puede ver la pantalla gráfica en la figura 1.6 donde se muestra las trazas de los

pulsos de tensión aplicados junto a la señal de la corriente voltamétrica. También se puede observar los menús de selección de las características del ensayo.

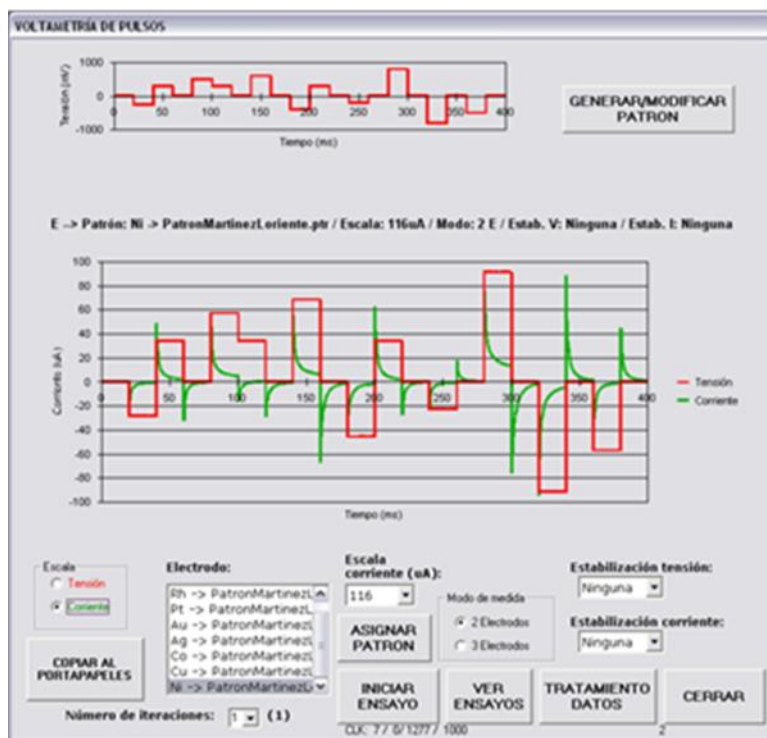


Figura 1.6. Aspecto de la pantalla de trabajo para las medidas voltamétricas.

Las características de la aplicación software son las siguientes:

- Configuración de los ensayos voltametría (selección del electrodo de trabajo, selección de la escala de corriente, selección del nivel de estabilización del potenciostato, secuenciación de los ensayos de voltametría de pulsos para los electrodos de trabajo configurados, generación de los patrones de pulsos).

- Configuración de los ensayos de espectroscopía de impedancias (rango de frecuencias, amplitud de señal, escala de corriente, modo del potencióstato, nivel de estabilización del potencióstato).
- Representación gráfica de los datos muestreados.
- Almacenamiento de los datos muestreados.
- Pre-procesado (eliminación, promediado y otros) de los datos recogidos y generación de los ficheros de datos para el posterior análisis estadístico.



## **Capítulo 2:**

**Método para el diseño de pulsos para  
las lenguas electrónicas voltamétricas.**





## 2.1. Introducción.

Una parte importante en el desarrollo de lenguas electrónicas, es diseñar el tren de pulsos adecuado a aplicar en caso en particular. Un conjunto de pulsos se pueden poner juntos para formar una onda que posea la forma adecuada para extraer tanta información como sea posible de la disolución y para lograr la máxima fiabilidad en la clasificación o la máxima exactitud en los procedimientos de cuantificación. Diferentes formas de onda han sido probadas como por ejemplo, los pulsos con forma *Large Amplitud Pulse Voltammetry* (LAPV), los pulsos con forma *Small Amplitud Pulse Voltmmetry* (SAPV), y los pulsos en forma de escalera. En general, la secuencia de pulsos más utilizada ha sido LAPV, en ejemplos como la clasificación entre varios zumos de naranja o diferentes licores de procedencia china<sup>108,109</sup> o para controlar la calidad de las aguas de desecho en una industria papelería<sup>110</sup>.

La mayoría de trabajos en los que se emplea más de un tren de pulsos, comparan entre trenes de pulsos previamente establecidos, pero en ningún trabajo se describe una metodología que permita identificar que parámetros son los más influyentes en los resultados finales, y como hay que gestionarlos a la hora de diseñar la forma más adecuada para cada aplicación.

En las lenguas electrónicas voltamétricas, la corriente que pasa por los electrodos se mide después de aplicar un pulso determinado. Esto se repite para una serie de

---

<sup>108</sup> F. Winqista, P. Wideb, I. Lundström. An electronic tongue based on voltammetry. *Anal. Chim. Acta* (1997) 357 21.

<sup>109</sup> A. Gutésa, F. Cespedesa, M. del Vallea, D. Louthanderb, C. Krantz-Rülckerb, F. Winqist. A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters. *Sensors and Actuators B: Chem* (2006) 115 390.

<sup>110</sup> P. Ivarsson S. Holmin, N.E. Höjer, C. Krantz-Rülcker, F. Winqist. Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sensors and Actuators B: Chem* (2001) 76 449.

pulsos, por lo general entre 20 y 25 pulsos y para una serie de electrodos, normalmente 4 electrodos. Para un electrodo dado, además de los procesos farádicos asociados con la oxidación o reducción de las especies redox-activas, también están presentes los procesos no-farádicos, relacionados con la corriente capacitiva, producida por la doble capa de compuestos cargados o polares situados cerca de la superficie del metal (electrodo de trabajo). Idealmente, en los sistemas más sencillos, la componente no-farádica de la respuesta eléctrica es la contribución más importante a la respuesta de la línea base. Con el fin de garantizar que esto suceda, es necesario controlar los límites de la ventana electroquímica, para así asegurarse de que el pulso eléctrico aplicado no causa la oxidación o reducción del disolvente o del electrolito de fondo. Además, en la literatura encontramos<sup>111</sup>, que se ha prestado muy poca atención al diseño de tren de pulsos de una manera sistemática para así obtener la secuencia de pulsos más apropiada en el uso de las lenguas electrónicas voltamétricas.

Se presenta aquí un estudio del comportamiento de los sistemas sometidos a pulsos eléctricos de corta duración y se propone una metodología para el diseño de diferentes tipos de pulsos inteligentes, para facilitar el estudio de disoluciones complejas utilizando una lengua electrónica voltamétrica. Se ha llevado a cabo el estudio sobre un sistema relativamente simple que contiene compuestos redox-activos que muestran procesos de oxidación y reducción reversibles, como son el ferroceno ( $\text{Fe}(\text{Cp})_2$ ), el 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ) y el complejo de cloruro de tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II) ( $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ ).

---

<sup>111</sup> P. Ivarsson, S. Holmin, N.E. Höjer, C. Krantz-Rülcker, F. Winqvist. Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sens. Actuators B:Chem* (2001) 76 449.

## 2.2. Intensidad de la corriente a través de una disolución.

Se han propuesto varios modelos de circuito eléctrico equivalente lineal para explicar el comportamiento de las disoluciones ante el paso de una corriente eléctrica<sup>112</sup>.

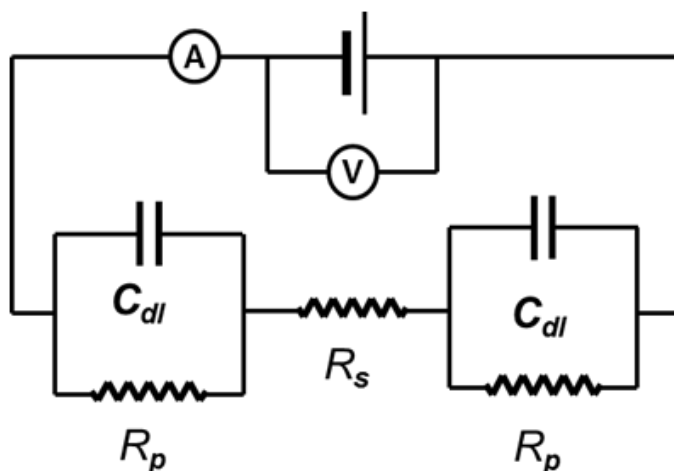


Figura 2.1. Circuito equivalente simplificado, para una celda electroquímica cuando se producen procesos electroquímicos Farádicos y No Farádicos, trabajando a dos electrodos nobles con un escalón de potencial de corriente continua.

En la Figura 2.1 se representa el circuito más simple que es capaz de interpretar de forma aproximada el comportamiento de una disolución cuando es sometida a un potencial suficientemente elevado como para producir un proceso farádico. Este es un modelo de circuito similar al propuesto por Randles<sup>113</sup>, pero sin la impedancia de Warburg que debe introducirse para el estudio con técnicas de corriente alterna, porque estamos trabajando con pulsos de corriente continua.

<sup>112</sup> J. C. Myland, K.B. Oldham. Cottrell's equation revisited: an intuitive, but unreliable, novel approach to the tracking of electrochemical diffusion. *Electrochem. Commun.* (2004) 6, 344.

<sup>113</sup> J. E. B. Randles. Kinetics of rapid electrode reactions. *Discuss. Faraday Soc.* (1947) 1, 11.

En este circuito,  $R_s$  es la resistencia eléctrica asociada al transporte de carga por los iones en la solución,  $R_p$  es la resistencia a la polarización, que se relaciona con la transferencia de electrones en el proceso de oxidación-reducción que se produce en la superficie del electrodo, y el  $C_{dl}$  es la capacidad eléctrica de la doble capa interfacial. Hay que señalar que este es un modelo aproximado. En particular, en este modelo el término  $R_p$  es una simplificación de la impedancia de polarización ( $Z_p$ ) que es un término más preciso cuando se habla de reacciones electroquímicas.

Para resolver matemáticamente este circuito de una manera aproximada se debe aceptar que el valor de la resistencia para la transferencia de electrones  $R_p$  catódica es igual a  $R_p$  anódica. Esta aproximación está justificada gracias a los principios de conservación de materia y carga. El circuito obtenido tras la aplicación de estos principios es el que se representa en la Figura 2.2.

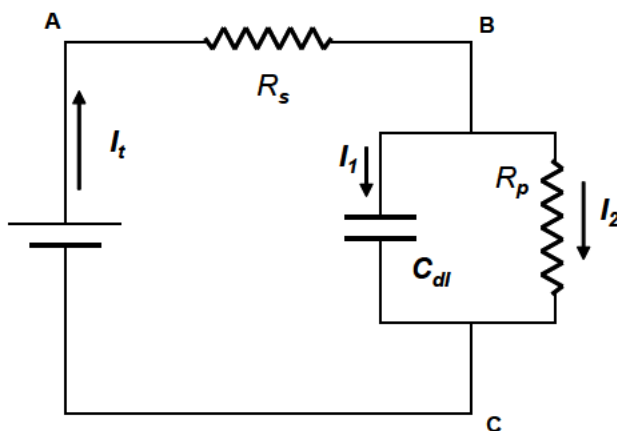


Figura 2.2. Circuito lineal equivalente de la celda electroquímica. ( $R_s$ : resistencia de la solución,  $R_p$ : resistencia a la polarización,  $C_{dl}$ : la capacidad de doble capa).

Con el fin de analizar el comportamiento de este circuito equivalente después de la aplicación de un pulso de corriente continua, se puede proponer la siguiente

ecuación diferencial, obtenida a partir de las leyes de Kirchhoff para mallas y nudos eléctricos:

$$V_{AC} = R_S \cdot \frac{dq}{dt} + \left(1 + \frac{R_S}{R_P}\right) \cdot \frac{q}{C_{dl}}$$

(2.1)

Donde  $V_{AC}$  es la diferencia de potencial aplicada durante el pulso eléctrico,  $q$ , es la carga almacenada en el condensador y  $t$  es el tiempo. Cuando se integra la ecuación diferencial se llega a:

$$q = \frac{C_{dl} \cdot V_{AC}}{1 + \frac{R_S}{R_P}} \left(1 - e^{-(1+R_S/R_P)t / R_S C_{dl}}\right) \quad (2.2)$$

Esta expresión permite calcular la carga en el condensador en función del tiempo cuando se aplica el pulso eléctrico de CC al circuito. Al ser esta expresión, una función del tiempo se puede obtener el valor de la intensidad de la corriente eléctrica necesaria para cargar el condensador, de la siguiente manera:

$$I_1 = \frac{V_{AC}}{R_S} e^{-(1+R_S/R_P)t / R_S C_{dl}} \quad (2.3)$$

Es fácil ver que la intensidad total de corriente que fluye a través de la resistencia polarizada será:

$$I_2 = \frac{V_{AC}}{R_P + R_S} \left(1 - e^{-(1+R_S/R_P)t / R_S C_{dl}}\right) \quad (2.4)$$

Y por lo tanto la intensidad total es:

$$I_t = \frac{V_{AC}}{R_p + R_s} \cdot \left(1 - e^{-(1+R_s/R_p)t/R_s C_{dl}}\right) + \frac{V_{AC}}{R_s} e^{-(1+R_s/R_p)t/R_s C_{dl}} \quad (2.5)$$

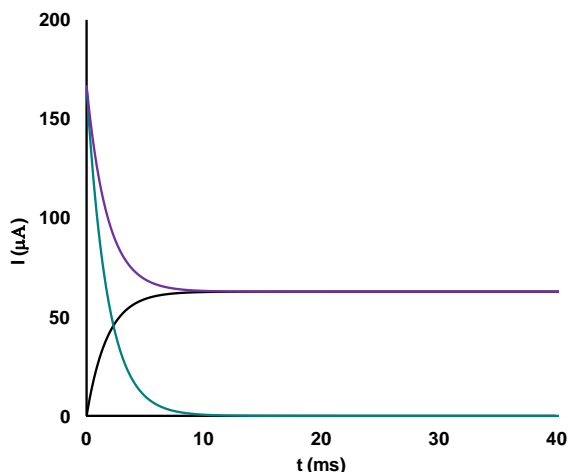


Figura 2.3. Intensidad de la corriente que fluye a través del circuito de la Figura 2.2, con  $C_{dl}$  30  $\mu$ F,  $R_s$  y  $R_p$  3 y 5  $k\Omega$ , respectivamente. Línea negra: corriente farádica ( $I_1$ ), línea verde: corriente no-farádica ( $I_2$ ), línea morada: corriente total ( $I_t$ ).

Por ejemplo, la Figura 2.3 muestra la evolución de la corriente cuando se aplica un pulso de 0.5 V, durante 40 ms, para un sistema formado por una resistencia  $R_s$  de 3  $k\Omega$ , un resistencia  $R_p$  de 5  $k\Omega$  y un condensador de 30  $\mu$ F.

Según este modelo, la intensidad de la corriente que fluye a través de  $R_p$  (corriente farádica), a tiempo cero no tiende a infinito, sino que tiende a cero. Esto, en principio contradice al modelo de Cottrell para un electrodo plano en un régimen controlado por difusión, que predice que a tiempo cero, el valor de la intensidad de la corriente debería tender a infinito<sup>114</sup>. Sin embargo, esta

<sup>114</sup> F. G. Cottrell. Der Residual current with galvanic polarization considered as a diffusion problem. Z. Phys. Chem. (1903) 42, 385.

contradicción desaparece cuando se analizan conjuntamente, todos los procesos que se dan de manera simultánea en el sistema.

Se sabe que la diferencia de potencial de un condensador depende de su carga eléctrica. Suponiendo que a tiempo cero, la carga eléctrica del condensador es cero, su potencial eléctrico también será cero ( $V_{BC} = 0$ ) y por lo tanto no hay corriente eléctrica que pueda fluir a través de la resistencia en paralelo,  $R_p$ . Tan pronto como la carga se acumula en el condensador, la diferencia de potencial eléctrico aumenta y posibilita el paso de corriente eléctrica a través de la resistencia lineal,  $R_p$ . Sin embargo, la presencia de un agente redox en la disolución, hace que  $R_p$  no se comporte como una resistencia lineal. La disolución solo permite corriente farádica, cuando el potencial eléctrico interfacial es similar al potencial redox del despolarizador. De hecho, si a tiempo cero, la diferencia de la tensión interfacial es cero, la corriente no-farádica debe pasar a través de la disolución. Bajo estas condiciones, la corriente eléctrica depende sólo de la resistencia eléctrica de la disolución y de la diferencia de potencial eléctrico aplicado. La forma y el tiempo de la caída de la intensidad de la corriente antes de la corriente farádica pueden ser importantes, ya que contienen información sobre la capacidad de la doble capa eléctrica. La capacidad de la doble capa se relaciona con la fuerza iónica de la disolución y con la presencia de sustancias neutras o iónicas capaces de ser adsorbidas en la superficie del electrodo. Por lo tanto, la corriente medida a tiempos muy cortos contiene información sobre la cantidad de especies iónicas o compuestos neutros, pero no proporciona información acerca de los procesos redox.

## 2.3. Experimental.

### 2.3.2. Preparación de las muestras.

Para llevar a cabo los estudios de simulación del circuito se han preparado disoluciones de  $\text{TBAClO}_4$   $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  en  $\text{CH}_3\text{CN}$  con diferentes concentraciones de ferroceno ( $0$ ,  $0.0005$ ,  $0.0010$  y  $0.0050 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

Para la caracterización del sistema formado por  $\text{Fe}(\text{Cp})_2$ , TCNQ y  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  se determinó el número de muestras y sus concentraciones siguiendo un diseño experimental en el que estableció un sistema de tres compuestos/tres niveles. El experimento diseñado considera los posibles efectos de las interacciones entre aniones, y proporciona un número total de 18 muestras. La distribución de los niveles de las distintas sales en cada muestra, se establecieron siguiendo un diseño experimental, mediante el uso del software MODE 8.0. Los niveles utilizados fueron: bajo ( $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ), medio ( $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ), y alto ( $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Además se midió una disolución con composición 0-0-0 que proporciona información sobre el disolvente. En la Tabla 2.1 se representa el diseño experimental realizado, donde se puede observar la concentración de cada componente en cada disolución patrón. Todas las muestras se midieron en cinco ocasiones con el fin de reducir al mínimo la posibilidad de error debido a la memoria de los electrodos.



Tabla2.1. Composición de las disoluciones según MODDE 8.0

Muestra	$\text{Fe(Cp)}_2$ (mol dm <sup>-3</sup> )x10 <sup>-4</sup>	TCNQ (mol dm <sup>-3</sup> )x10 <sup>-4</sup>	$[\text{Ru(bipy)}_3]^{2+}$ (mol dm <sup>-3</sup> )x10 <sup>-4</sup>
1	10	10	1
2	1	10	10
3	5	5	5
4	10	1	5
5	1	10	1
6	10	5	10
7	10	10	10
8	10	10	10
9	10	10	10
10	1	1	1
11	1	1	10
12	10	1	10
13	10	10	10
14	1	1	5
15	5	1	10
16	5	1	1
17	10	1	1
18	10	1	10
19	0	0	0

### 2.3.2. El sistema electrónico y preparación de la lengua electrónica.

Para esta aplicación se ha utilizado solo la lengua de metales nobles compuesta por los metales Pt, Rh, Ir y Au como electrodos de trabajo, el cilindro de acero inoxidable como contraelectrodo y un electrodo saturado de calomelanos como electrodo de referencia. El equipo utilizado para generar los pulsos y medir las respuestas fue el segundo prototipo desarrollado en el IDM (ver Capítulo 1).

## 2.4. Estudio electroquímico.

El estudio de la lengua electrónica se realizó en  $\text{CH}_3\text{CN}$  con  $\text{TBAClO}_4$  0.01 M como electrolito de fondo en atmósfera de argón. La temperatura de trabajo fue de 25.0 °C. El electrodo de referencia fue un electrodo de calomelanos saturado (SCE), que fue conectado a la celda a través de un puente salino. Para este estudio se han utilizado tres compuestos redox activos, que muestran de manera bien definida los procesos farádicos en disolución de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , como son, el ferroceno ( $\text{Fe}(\text{Cp})_2$ ), el tetracianoquinodimetano (TCNQ) y el cloruro de tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II) ( $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ ).

### 2.4.1. Estudio de la intensidad de corriente farádica y no-farádica.

Como ya comentamos anteriormente, el circuito equivalente que se muestra en la Figura 2.1 se puede utilizar para explicar el comportamiento de un electrodo en una disolución cuando se aplica un pulso de potencial eléctrico de CC. A fin de estudiar esto con más detalle, y de manera preliminar, hemos realizado un estudio experimental de la corriente total que fluye a través de la celda, cuando se aplica una onda de pulso cuadrada con tiempos de muestreo cortos (0.05 ms) en disoluciones de  $\text{TBAClO}_4$  0.01  $\text{mol dm}^{-3}$  en  $\text{CH}_3\text{CN}$  y diferentes concentraciones de  $\text{Fe}(\text{Cp})_2$  (0, 0.0005, 0.0010 y 0.0050  $\text{mol dm}^{-3}$ ). Cada disolución fue preparada

en tres ocasiones. La medida de la corriente experimental se repitió 5 veces para cada muestra con un pulido previo del electrodo de trabajo.

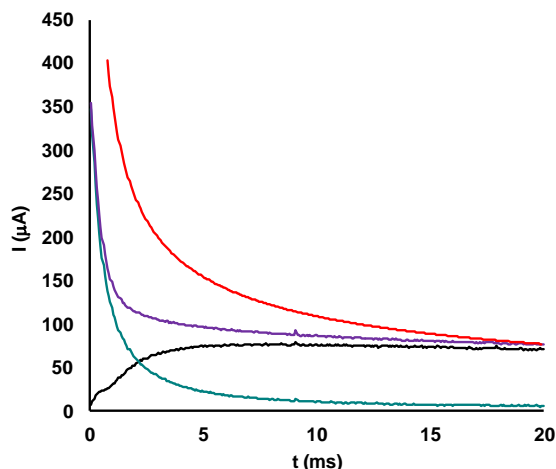


Figura 2.4. Datos experimentales para  $I_t$  (línea morada) e  $I_2$  (línea negra), para el ferroceno  $0.001 \text{ mol dm}^{-3}$  en  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{TBAClO}_4$   $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$ , y  $I_1$  (línea verde) para la línea base ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{TBAClO}_4$   $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$ ) Intensidad farádica de Cottrel (línea roja).

La Figura 2.4 muestra la intensidad obtenida con un electrodo de Pt rotatorio, a 3000 rpm para una disolución  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TBAClO}_4$  después de la aplicación de un pulso de 20 ms a 0.4 V. La línea verde corresponde a la respuesta de la disolución en ausencia de procesos farádicos, que es equivalente a la curva de carga típica de un condensador eléctrico con un aumento de tiempo de aproximadamente 10 ms. La línea morada de la Figura 2.4, muestra la repuesta de la  $I_t$  obtenida para la disolución de  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TBAClO}_4$  en presencia de ferroceno ( $C = 0.001 \text{ M}$ ). En este caso, además de la respuesta de la disolución  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TBAClO}_4$  (línea verde), se produce una oxidación adicional del ferroceno lo que da lugar a una corriente farádica. Cabe destacar que, la curva de  $I_t$ , en presencia de ferroceno (línea morada) tiene un origen muy próximo al de la curva de la línea de base. La diferencia entre el valor inicial ( $I_1$ ) y la respuesta de la disolución en presencia de

ferroceno ( $I_t$ ) se traduce en la curva correspondiente a la corriente farádica ( $I_2$ ) (línea negra). La sustracción de intensidades ofrece una línea similar a la prevista por el modelo eléctrico desarrollado previamente para la corriente farádica, y por lo tanto se puede asociar con el valor de la resistencia de polarización  $R_p$  del esquema anterior (ver Figura 2.2).

La Figura 2.4 muestra también la corriente esperada según el modelo de Cottrell (línea roja)<sup>115,116</sup>. En esta figura, se puede observar de manera evidente que este modelo no predice adecuadamente la intensidad de la corriente para tiempos muy cortos. Sin embargo, para tiempos superiores a 50 ms la coincidencia de los datos experimentales con el modelo de Cottrell es excelente.

Como resultado de este experimento simple, podemos aceptar que el intervalo de tiempo que va de 0 a 10 ms, ofrece información acerca de los procesos no-farádicos, asociados con el contenido en la disolución de especies conductoras y de especies capaces de modificar las propiedades de la doble capa eléctrica. Por otra parte, en el rango de 10 a 20 ms, la información obtenida se asocia casi exclusivamente con procesos farádicos, de hecho, después de este tiempo la intensidad de la corriente eléctrica para la doble capa tiende a cero. Después de verificar las características de la información obtenida a partir de la duración de los pulsos eléctricos, se diseñaron las formas de onda que se utilizaron para caracterizar este sistema, es decir, las especies activas redox  $\text{Fe}(\text{Cp})_2$ , TCNQ y  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ .

---

<sup>115</sup> J.C. Myland, K.B. Oldham. Cottrell's equation revisited: an intuitive, but unreliable, novel approach to the tracking of electrochemical diffusion. *Electrochem. Commun.* (2004) 6, 344.

<sup>116</sup> F.G. Cottrell. Der Reststrom bei galvanischer Polarisation, betrachtet als ein Diffusionsproblem. *Z. Phys. Chem.* (1903) 42, 385.

### 2.4.2. Estudios mediante voltametría cíclica.

Antes de diseñar las formas de ondas utilizadas con la lengua electrónica, hemos estudiado por voltametría cíclica el comportamiento redox del  $\text{Fe}(\text{Cp})_2$ , del TCNQ y de la  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  en  $\text{CH}_3\text{CN}$ , con el fin de determinar su potencial de oxidación y de reducción. La Tabla 2.1 muestra los valores de pico de oxidación y reducción obtenidos para los compuestos de interés, cuando se utiliza el Pt como electrodo de trabajo y una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Los valores de los potenciales redox se midieron frente al SCE a  $25^\circ\text{C}$ .

Tabla 2.1. Potenciales anódicos  $E_{\text{pa}}$  y catódicos  $E_{\text{pc}}$  frente al SCE, para el electrodo de platino con una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para el  $\text{Fe}(\text{Cp})_2$ , el TCNQ y la  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  en  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{TBAClO}_4$   $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  como electrolito de fondo en atmósfera de argón a  $25^\circ\text{C}$ ).

Compuesto	$E_{\text{pa}}$	$E_{\text{pc}}$
$\text{Fe}(\text{Cp})_2 / \text{Fe}(\text{Cp})_2^+$	+0.410	+0.350
$\text{TCNQ} / \text{TCNQ}^-$	+0.180	+0.120
$\text{TCNQ}^- / \text{TCNQ}^{2-}$	-0.270	-0.330
$[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+} / [\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$	+1.10	+0.90
$[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+} / [\text{Ru}(\text{bipy})_3]^+$	-1.30	-1.20
$[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^+ / [\text{Ru}(\text{bipy})_3]$	-1.60	-1.50

El voltagrama cíclico del ferroceno muestra un pico de oxidación reversible en  $\text{CH}_3\text{CN}$  a  $410 \text{ mV}$  vs SCE ( $\Delta E_{\text{pico}} = 60 \text{ mV}$ ). Los estudios realizados utilizando un electrodo de disco rotatorio (RDE) confirmaron este resultado y ofrecieron un potencial de onda media de  $380 \text{ mV}$  vs SCE para la oxidación del ferroceno. El voltagrama cíclico del TCNQ en  $\text{CH}_3\text{CN}$ , muestra claramente dos procesos consecutivos de reducción reversibles a  $180$  y  $-270 \text{ mV}$ . La voltametría con RDE,

muestra dos ondas con un potencial de onda media de 176 y -300 mV para el TCNQ. Para la  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ , la voltametría por RDE muestra un proceso de oxidación reversible con potencial de media onda de 1.05 V y un proceso de doble reducción con un potencial de onda media de -1.30 a -1.60 V. Todos estos resultados son consistentes con los valores ya descritos en la literatura, aunque no exactamente iguales debido a que no se ha corregido la caída óhmica presente en todo sistema electroquímico y que adquiere importancia, si como en este caso, se emplea un puente salino para conectar el electrodo de referencia a la celda electroquímica<sup>117</sup>.

### **2.4.3. Diseño del tren de pulsos.**

Diferentes formas de onda se han probado: LAPV, SAPV y Pulso Inteligente 1 y 2. También hemos estudiado los efectos de la duración del pulso en la exactitud y precisión de las predicciones hechas por la lengua electrónica voltamétrica. Para este estudio se han elegido pulsos de tiempos de 40 y 100 ms.

---

<sup>117</sup> A. J. Bard, L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, (1980).

#### 2.4.3.1. Pulsos LAPV y SAPV.

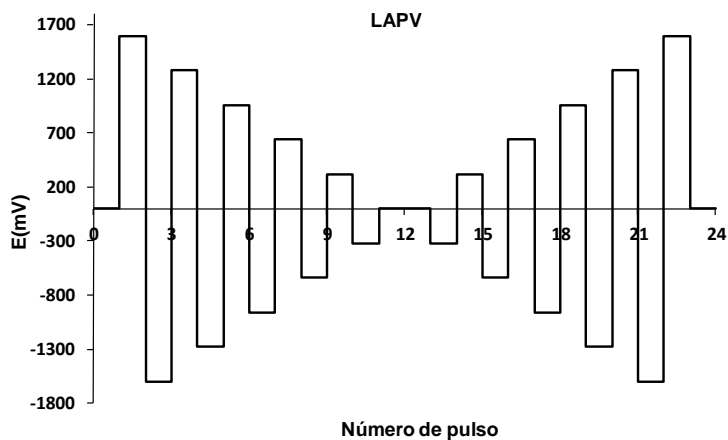


Figura 2.5. Esquema del set de pulsos LAPV.

La Figura 2.5 muestra el tren de pulsos LAPV la cual se ha diseñado partiendo de un potencial inicial de 0 V. A partir de este valor, el potencial salta a 1.6 V y luego, de ahí a -1.6 V. Estos saltos se repiten con un aumento de  $\pm 320$  mV desde el potencial de partida y por último, el sistema vuelve al valor del potencial inicial.

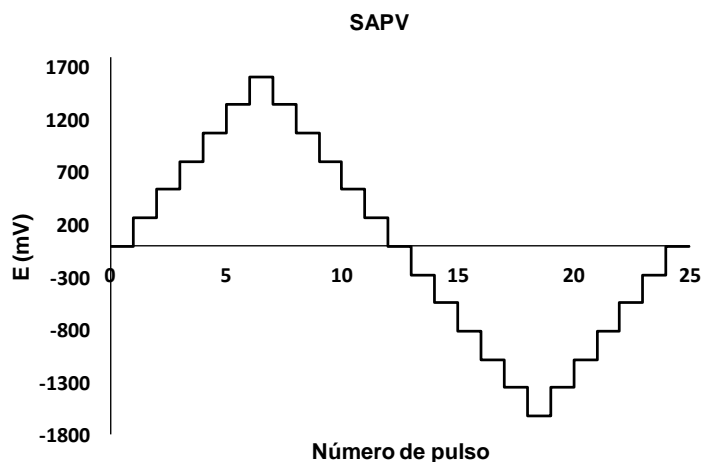


Figura 2.6. Esquema del set de pulsos SAPV

El diseño de la secuencia SAPV se ha realizado a partir de un potencial inicial de 0 V, aumentando cada 40 o 100 ms, en 270 mV el potencial inicial aplicado, hasta alcanzar un valor máximo final de 1.62 V vs el electrodo de referencia. A partir de este potencial máximo, se produce la disminución de -270 mV hasta alcanzar el potencial de -1.62 V. Finalmente se aumenta el potencial con saltos de 270 mV hasta alcanzar de nuevo el valor potencial inicial. Ver Figura 2.6.

#### 2.4.3.2. Pulso inteligente para el sistema reversible

Para el diseño la secuencia llamada pulso inteligente se tuvo en cuenta la información del potencial de oxidación-reducción determinado para cada uno de los componentes que forman la mezcla, es decir,  $\text{Fe}(\text{Cp})_2$ , TCNQ y  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ . A partir la de voltametría cíclica se obtuvieron un total de doce picos de oxidación/reducción. El método utilizado para el diseño del tren de pulsos se basó en las siguientes ideas:

1. Comenzar, si es posible, a partir de un potencial inicial en el que no haya ningún proceso redox,



- Esta estrategia deja mucha libertad para el diseño de la secuencia de pulsos. De entre todas las posibilidades, hemos elegido dos estrategias diferentes para crear las secuencias, estudiando cómo afecta el orden en que se aplican los pulsos y la duración de los mismos, en la exactitud de los modelos de predicción.

## Pulso Inteligente 1



103

potencial inicial, en este caso 0 V, y a continuación, saltar al potencial del pico anódico o catódico más próximo. Desde este punto, volver al potencial del pico correspondiente al proceso electroquímico reverso, para un mismo compuesto. Cuando ha transcurrido el tiempo establecido, 40 o 100 ms, el potencial se incrementa hasta el valor de potencial del segundo pico más próximo (independientemente de que su potencial esté asociado con un proceso de oxidación o de reducción), entonces el potencial pasa al máximo de potencial contrario y vuelve al punto de partida. Esta operación se repite con todos los picos que representan al sistema, obtenidos mediante voltametría cíclica. La Figura 2.7 muestra un esquema del Pulso Inteligente 1.

b) Segunda estrategia:

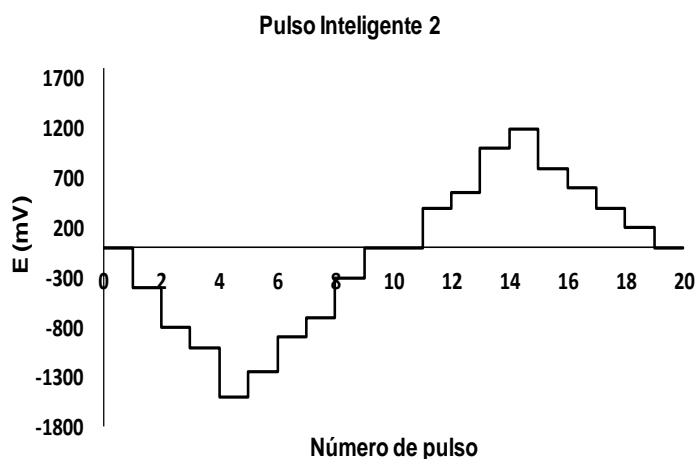


Figura 2.8. Esquema del set de pulsos Pulso inteligente Tipo 2.

Teniendo en cuenta el éxito de los pulsos con forma SAPV, este método se basa en la creación de una secuencia formada por pequeños saltos de potencial de

manera que incluya todos los picos presentes en la muestra. Como muestra la Figura 2.8, para diseñar esta secuencia, se parte de un potencial inicial de 0 V. Este potencial va disminuyendo de forma progresiva mediante pequeños descensos en el potencial hasta llegar al potencial catódico máximo. Cuando se alcanza este máximo, se invierte la dirección de barrido, hasta llegar al potencial anódico máximo, y vuelve a decrecer hasta el potencial inicial. Esta secuencia de potenciales ha sido denominada como Pulso inteligente 2.

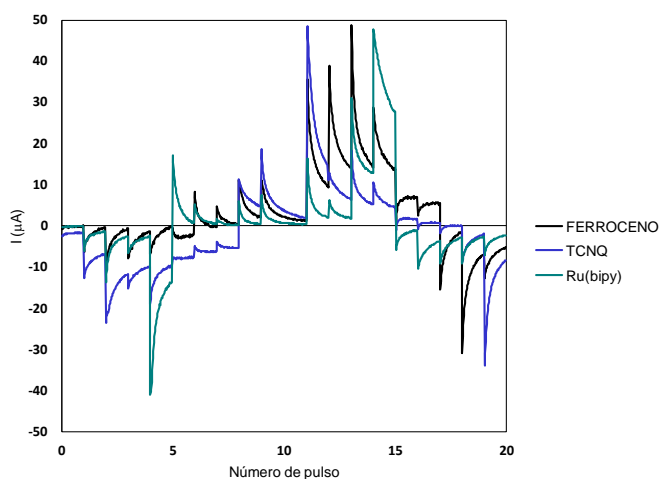


Figura 2.9. Respuesta electroquímica del Pt para la forma el Pulso Inteligente Tipo 2.

La Figura 2.9 muestra un ejemplo de la respuesta electroquímica obtenida al aplicar la secuencia de pulsos de Pulso Inteligente Tipo 2, sobre un electrodo de Platino, para 3 muestras en las que cada una de ellas contiene uno de los tres productos a estudiar, y que usan como disolvente  $\text{CH}_3\text{CN}$  con  $\text{TBAClO}_4$  a una concentración de  $0.001 \text{ mol dm}^{-3}$ , bajo atmósfera de Ar y a  $25^\circ\text{C}$ . De acuerdo con la Figura 2.8, el primer pulso tiene un potencial de 0 V vs SCE. Para el TCNQ la forma de la señal intensidad/tiempo, muestra una pequeña corriente inicial catódica relacionada con la generación de  $\text{TCNQ}^-$  (el primer potencial de

reducción para este compuesto es sólo 180 mV). Cuando a este compuesto se le aplica el segundo y el tercer pulso, se produce un aumento de la intensidad debido a que se alcanza el segundo pico de reducción de esta especie y se forma  $\text{TCNQ}^{2-}$ . Cuando se llega al pulso número 9, los valores de corriente muestran la oxidación del compuesto  $\text{TCNQ}^{2-}$ , previamente formando. Cuando el barrido de potencial alcanza el valor de 400 mV (pulso 11), se observa un pico significativo, asociado a la oxidación del anión  $\text{TCNQ}^-$  para dar  $\text{TCNQ}$ . A partir de este momento, la intensidad disminuye gradualmente aproximándose a 0  $\mu\text{A}$  en el pulso 18. Finalmente, alcanzado el pulso 20 de 0 V, se observa claramente que el compuesto se vuelve a reducir una vez más.

Para el ferroceno, los primeros 11 pulsos que se aplican en la zona catódica no proporcionan ninguna información especial porque en este rango, esta especie no sufre procesos redox. Cuando se llega al pulso 12, se observa claramente una corriente anódica, la cual se atribuye a la oxidación del ferroceno a ferricinio. La intensidad aumenta significativamente en los siguientes cuatro pulsos, y el ferroceno se convierte en el mayor contribuyente al flujo de corriente en esta región de potencial. En el pulso 18, el proceso redox se invierte y la corriente ahora es catódica debido a la reducción del ferricinio a ferroceno.

El complejo de rutenio muestra dos zonas distintas bien diferenciadas. La primera de ellas, está relacionada con los pulsos 5 y 6. El pulso 5 muestra la reducción de  $\text{Ru(II)}$  a  $\text{Ru(I)}$ , mientras que el pulso 6 muestra una corriente anódica cuando se invierte el barrido de potencial, hecho asociado con la reversibilidad del proceso de reducción. La segunda área importante de la  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ , corresponde a los pulsos 14 y 15, donde se produce la oxidación de  $\text{Ru(II)}$  a  $\text{Ru(III)}$ .

## 2.5. Resultados.

Para este estudio se ha utilizado sólo una lengua electrónica formada por metales nobles. Por otra parte, el estudio se llevó a cabo bajo atmósfera de argón. Todas las muestras han sido preparadas en  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{TBAClO}_4$  como electrolito de fondo. Los estudios se llevaron a cabo utilizando los modelos PLS1 con el fin de saber si se puede determinar la concentración de las especies redox-activas en mezclas formadas por 3 compuestos:  $\text{Fe}(\text{Cp})_2$ , TCNQ y  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ ; y la precisión con la que es alcanzada. Tras la aplicación de un diseño experimental (MODDE 8.0), se estableció el número de muestras necesarias para la calibración, así como los niveles de cada uno de los compuestos para cada muestra. El conjunto de calibración final incluyó 18 disoluciones preparadas mediante la adición de cada uno de los tres compuestos seleccionados a la matriz del disolvente ( $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TBAClO}_4$   $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$ ) con niveles bajo, medio y alto. La concentración de cada uno de estos niveles fue  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  y  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , respectivamente. El proceso de calibración se repitió dos veces, con la preparación de nuevas muestras, respetando los niveles de concentración previstos, por lo que el número final de muestras estudiadas fue de 54. Cada disolución se midió de manera aleatoria, cinco veces de forma iterativa para cada electrodo, para en una etapa de pre-procesado de los datos realizar la media de las 5 iteraciones con el fin de aumentar la relación señal/ruido.

Para este estudio, se llevaron a cabo dos tipos de modelos de PLS1. En el primer tipo, los modelos se calcularon con los valores corriente promediados, obtenidos para cada muestra, mientras que en el segundo tipo, se introdujo una etapa de pre-procesamiento de datos, que consistió en restar a cada muestra el valor de corriente medio del disolvente que contenía el electrolito de fondo. El número de variables latentes (calculadas mediante el método de "leave-one-out", necesarias

para aplicar el PLS, fue determinado mediante un proceso de validación cruzada y dio como resultado un número de 4 variables latentes.

Tabla 2.2. Parámetros de ajuste ( $r^2$  y RMSEC) para los modelos de PLS1 creados, para las tres especies estudiadas, y el valor medio, cuando las secuencias que se aplican tienen una duración de 40 ms, para los datos de corriente sin la resta de la línea base.

		Pulsos inteligentes			
		LAPV	SAPV	Tipo 1	Tipo 2
$r^2$	ferroceno	0.914	0.997	0.977	0.981
	TCNQ	0.926	0.961	0.979	0.982
	$[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$	0.951	0.943	0.944	0.968
	Valor medio	0.930	0.967	0.967	0.977
RMSEC ( $\cdot 10^{-5}$ )	ferroceno	12.292	2.402	6.303	5.804
	TCNQ	10.975	8.257	5.932	5.443
	$\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$	9.288	10.229	9.873	7.599
	Valor medio	10.851	6.963	7.369	6.282

La Tabla 2.2 muestra los parámetros obtenidos en los estudios de PLS1, para los cuatro tipos de pulsos utilizados en este trabajo cuando la duración de los pulsos, en todas las formas de onda, es de 40 ms. Si se comparan todos ellos, es evidente que los resultados obtenidos con el tren de pulsos LAPV, son de menor calidad que los obtenidos al aplicar cualquiera de los otros tres tipos. Tal y como se ha explicado anteriormente, esta secuencia de pulsos fue diseñada mediante la elección de pulsos al azar, sin tener en cuenta la información electroquímica de las distintas especies, por lo que probablemente esta secuencia no contenga los pulsos adecuados capaces de producir procesos de oxidación o reducción selectivos a cada especie. De hecho, es fácil ver que el tren de pulsos LAPV aplica pulsos que mezcla información que procede tanto de la reacción de oxidación del

ferroceno, como del primer proceso redox del TCQN, debido a que no hay un par de pulsos eléctricos similares a sus respectivos potenciales de onda media (+160 mV y +380 mV).

En un segundo paso de nuestro estudio, debido al uso de la disolución de TBAClO<sub>4</sub> en acetonitrilo como electrolito de fondo, se ha llevado a cabo la corrección de la intensidad de corriente mediante la resta de la corriente de la línea base (disolvente + electrolito de fondo), a los datos de intensidad de corriente obtenidos en presencia de las especies redox activas.

Tabla 2.3. Parámetros de ajuste ( $r^2$  y RMSEC) para los modelos de PLS1 creados, para las tres especies estudiadas, y el valor medio, cuando las secuencias que se aplican tienen una duración de 40 ms, para los datos de corriente una vez restada la línea base.

		Pulso inteligente			
		LAPV	SAPV	Tipo 1	Tipo 2
$r^2$	ferroceno	0.925	0.997	0.98	0.984
	TCNQ	0.904	0.966	0.984	0.984
	[Ru(bipy) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	0.971	0.957	0.954	0.977
	Valor medio	0.933	0.973	0.9726	0.9816
RMSEC ( $\cdot 10^{-5}$ )	ferroceno	8.593	2.299	5.914	5.211
	TCNQ	12.427	7.697	5.2	5.337
	[Ru(bipy) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	7.531	8.74	9.031	6.359
	Valor medio	9.517	6.245	6.715	5.636

Como muestra la Figura 2.4, al restar  $I_1$  de  $I_t$ , se obtiene la curva correspondiente a la corriente farádica ( $I_2$ ). Los datos del análisis PLS1 después de realizar esta sustracción se muestran en la Tabla 2.3. Comparando las Tablas 2.2 y 2.3, se

observa una tendencia general que muestra una mejor capacidad predictiva cuando se resta la línea base.

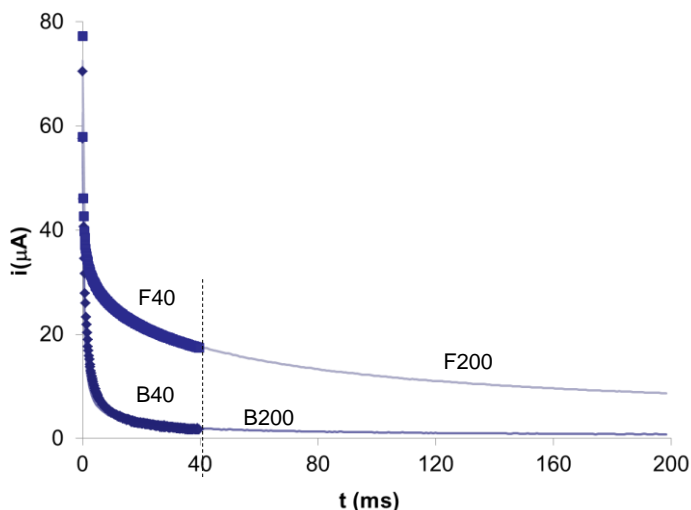


Figura 2.10. Intensidad de corriente cuando se aplica un pulso de 400 mV de 40 y 200 ms a una disolución de  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{TBAClO}_4$ ,  $25.0^\circ\text{C}$ ) (B40 y B200) y de la misma disolución en presencia de ferroceno  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  (F40 y F200).

Por último, se ha estudiado el efecto que produce en la capacidad de predicción, un aumento en la duración de los pulsos. Este estudio se ha realizado solamente sobre los pulsos inteligentes Tipo 1 y Tipo 2.

La Figura 2.10 muestra la intensidad de corriente cuando se aplica un pulso de 400 mV, con duración de 40 y 200 ms, a una disolución de  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{TBAClO}_4$ ,  $25.0^\circ\text{C}$ ) (B40 y B200) y a una disolución que contiene ferroceno con una concentración de  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  (F40 y F200).

Se puede extraer de esta figura, que cuando se trabaja con pulsos cortos, tiempos menores de 20 ms, los efectos no-farádicos juegan un papel importante, pero que cuando aumenta la duración del pulso, la intensidad asociada con los efectos



no-farádicos tiende a cero. Por ejemplo, a 200 ms, la intensidad de corriente se mantiene prácticamente constante e inferior a  $0.7 \mu\text{A}$ , para la respuesta de la línea base (B200). Además hay una clara corriente farádica que se relaciona con la concentración de la especie electroactiva en la disolución, en este caso ferroceno (F200). Sobre la base de estos resultados, se han llevado a cabo estudios de PLS1 en los que la duración de pulso es de 100 ms usando las formas de onda Inteligentes Tipo 1 y Tipo 2.

Tabla 2.4. Parámetros de ajuste ( $r^2$  y RMSEC) para los modelos de PLS1 creados, para las tres especies estudias, y el valor medio, cuando las secuencias que se aplican tienen una duración de 40 ms (A) y 100 ms (B), para los datos de corriente una vez restada la línea base.

		A		B
		Tipo 1	Tipo 2	Tipo2
$r^2$	ferroceno	0.987	0.989	0.992
	TCNQ	0.989	0.99	0.994
	$[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$	0.971	0.98	0.981
	Valor medio	0.982	0.986	0.989
RMSEC	ferroceno	4.724	4.667	3.673
	TCNQ	4.445	4.385	3.324
	$*10^{-5} [\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$	7.086	5.721	5.33
	Valor medio	5.418	4.857	4.109

La Tabla 2.4 muestra un resumen de los resultados obtenidos en términos de  $r^2$  y RMSEC para la predicción de la concentración de ferroceno, TCNQ y  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ , a 40 ms, columna A y a 100 ms, B. Cuando se comparan los resultados obtenidos a distintos tiempos de duración de los pulsos, se comprueba que, los parámetros de ajuste  $r^2$  y RMSEC se aproximan más a 1 y a 0, respectivamente cuando se emplean tiempos de pulso más largos. Por ello, podemos decir que el tiempo de

medida juega un papel importante en la exactitud de las predicciones hechas por el modelo. Esto puede ser debido a lo siguiente:

Cuando se produce un salto de potencial eléctrico, la doble capa eléctrica requiere una reorganización, lo que causa el paso de una cantidad de corriente no-farádica. La intensidad de la curva de corriente no-farádica vs tiempo, puede verse afectada por factores tales como un buen pulido de la superficie de los electrodos, pequeños cambios de temperatura, pequeñas vibraciones mecánicas transmitidas a la disolución, etc. Se ha encontrado que el valor de la intensidad de la corriente inicial, en el momento cero de cada pulso, muestra diferencias de hasta un 10% en el promedio de la intensidad de corriente de una serie de repeticiones. Sin embargo, los valores de intensidad de la corriente convergen rápidamente y las diferencias prácticamente desaparecen tras unos 10 ms del comienzo del pulso. Si el pulso se aplica durante un largo período de tiempo, el sistema puede alcanzar un nivel estable de intensidad de corriente, asociado con la oxidación o reducción de especies disueltas y la intensidad de corriente es causada sólo por la velocidad de difusión de las diferentes especies hacia los electrodos.

Por último, se encontró que la intensidad de la corriente no-farádica después de aplicar un determinado pulso es más o menos proporcional a la amplitud del salto de potencial eléctrico. Como ya se ha dicho, la intensidad de la corriente no-farádica puede verse afectada por varios factores, entonces, cuando el salto de potencial eléctrico es muy grande, se obtiene una gran corriente, pero la incertidumbre en la medida aumenta. Esta razón puede ser la causa de que las formas de onda en forma de escalera o SAPV presenten, en general, una mayor precisión que las diseñadas con grandes saltos de potencial eléctrico.

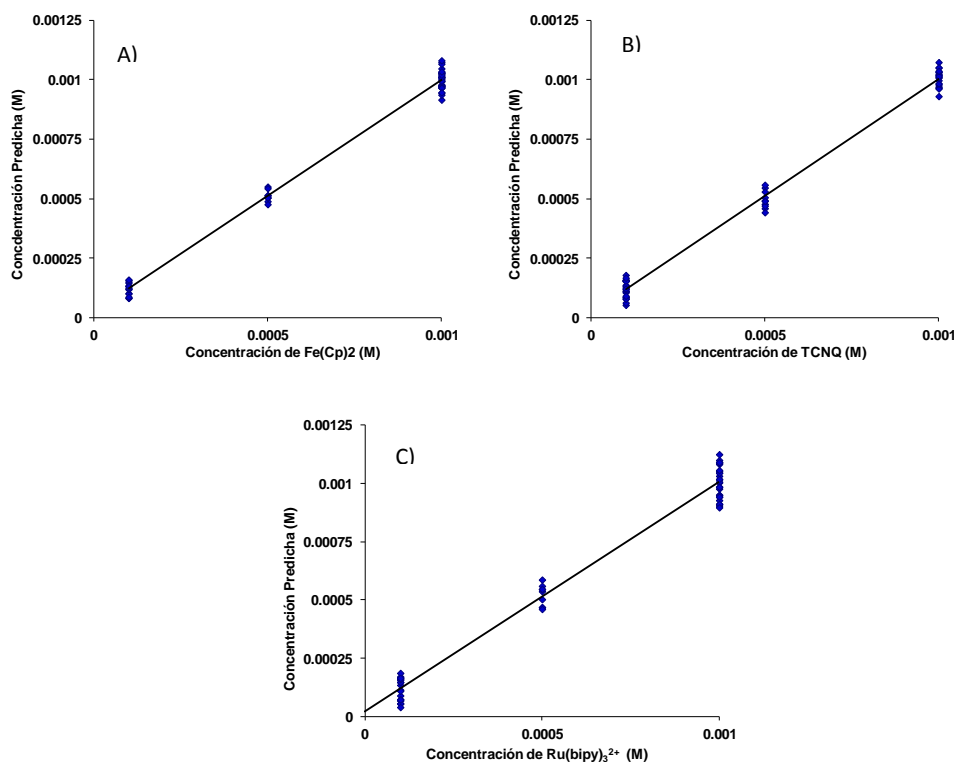


Figura 2.11. Predicho frente a la concentración experimental de (A) ferroceno, (B) y TCNQ (C)  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  en 54 mezclas preparadas para los niveles bajos ( $0.0001 \text{ mol dm}^{-3}$ ), medio ( $0.0005 \text{ mol dm}^{-3}$ ) y alto ( $0.001 \text{ mol dm}^{-3}$ ), para el pulso inteligente tipo 2 y con una duración de 100 ms.

Finalmente, con el fin de reducir el error introducido por los procesos no-farádicos, a tiempos muy cortos, se ha probado el efecto que tiene sobre los parámetros de ajuste de los modelos de predicción PLS1, la eliminación de los valores de corriente de la primera iteración del conjunto de 5 iteraciones, cuando se utiliza el set de pulsos inteligente Tipo 2 (ver Tabla 2.4B). Estos valores finales se corresponden con las mejores predicciones que se han obtenido. Como ejemplo de la exactitud de los resultados. La Figura 2.11 muestra la concentración predicha de los tres compuestos frente a los valores de ferroceno, TCNQ y  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  experimentales en las mezclas preparadas con el método descrito anteriormente.



## 2.6. Conclusiones.

Se ha realizado un estudio de las condiciones que permitan mejorar la capacidad de predicción de la lengua electrónica voltamétrica, que ha demostrado la importancia en el diseño de un tren de pulsos que contenga de forma ordenada la información redox de las especies que se desean detectar, en este caso, ferroceno, TCNQ y  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  en mezclas formadas por distintos niveles de los tres compuestos.

Para ello se han aplicado 4 formas de onda diferentes, como son, LAPV, SAPV y los Pulsos Inteligentes Tipo 1 y Tipo 2, consiguiendo en general una buena predicción, obteniendo unos modelos de predicción mejores usando el Pulso Inteligente de mayor duración (Tipo 2 o de 100 ms). Además de los estudios realizados se observó que la capacidad de la lengua electrónica para la cuantificación de ferroceno, TCNQ y  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  es mejor cuando:

1. Se diseña un set de pulsos que esté en concordancia con el potencial voltamétrico máximo de la especie.
2. El conjunto de pulsos se organiza con forma de escalera.
3. La intensidad de corriente de la línea de base se resta de la intensidad de corriente del pulso de las muestras.
4. Cuando se retira del conjunto de iteraciones, los valores de corriente correspondientes a la primera iteración.
5. Cuando la duración del pulso es suficientemente larga para que la doble capa pueda reorganizarse.

Creemos que este estudio en un sistema modelo puede mejorar el diseño de trenes de pulsos en las muestras más complejas.



## 2.7. Conclusions.

We performed a study of the conditions which improve the prediction capability of the voltammetric electronic tongue. The importance in the design of a pulse array that contains redox information of the compounds that are wished to detect, in this case, ferrocene TCNQ and  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  in mixtures of various levels of the three compounds has been demonstrated.

Four different pulse arrays, such as, LAPV, Smart Pulse SAPV and Type 1 and Type 2 have been applied. Generally, all the pulse arrays offer good predictions, obtaining better prediction models using Smart Pulse longer (Type 2 or 100 ms). Moreover from the studies carried out it was observed that the ability of electronic tongue for quantification of ferrocene, TCNQ and  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{+2}$  using PLS1 improved when:

1. An array of pulses in accordance with the voltammetric peak potential of the species was designed.
2. The array of pulses was organized as a Staircase.
3. The current intensity of the baseline was subtracted from the pulse current intensity of the samples.
4. When the starting points of each pulse were removed from the data set.
5. When the pulse duration is long enough so that the double layer can reorganize.

We believe that this study on a model system may improve the design of pulse arrays in more complex samples.





## **Capítulo 3:**

# **Detección y cuantificación de simulantes de agentes nerviosos mediante el uso de lenguas electrónicas**



### 3.1. Introducción.

El aumento actual de la preocupación internacional en relación con ataques criminales por parte de los terroristas mediante el uso de agentes de guerra química (Chemical Warfare Agents, CWA), ha provocado un creciente interés en el desarrollo de los métodos de detección de estos productos químicos que sean fiables y asequibles. Según la Organización para la Prohibición de Armas Químicas y los convenios de armas químicas, las sustancias son consideradas armas químicas cuando "producen un efecto químico en los procesos biológicos, que puede provocar la muerte, la pérdida temporal de su función o una lesión permanente en las personas o animales". Algunos de los problemas que presentan estos compuestos químicos, además de su elevada toxicidad, son sus elevados tiempos de permanencia, es decir, se almacenan durante tiempos elevados sin que sufran procesos de degradación. Además, son compuestos relativamente resistentes al agua, al aire y al calor, por lo que sus efectos no se pierden cuando se dispersan. Los agentes de guerra química se clasifican como: agentes nerviosos, sanguíneos, asfixiantes, vesicantes, pulmonares, lacrimógenos, incapacitantes a y proteínas citotóxicas<sup>118,119</sup>.

Dentro de las armas químicas, los agentes nerviosos figuran como especialmente peligrosos ya que tienen efectos rápidos y severos en la salud humana y animal. El envenenamiento se puede producir directamente por el contacto con estos agentes, bien en estado líquido o gaseoso, o se puede presentar a través de la inhalación o la ingesta de líquidos o alimentos contaminados con estos agentes.

---

<sup>118</sup> W. S. Angerson. Chemical and biological warfare agents. A review of the scientific Literature as it Pertains to Gulf War Illnesses, RAND 2000.

<sup>119</sup> D. R. Walt, D. R. Franz. Peer reviewed: Biological warfare detection. Anal. Chem. (2000) 72, 738A.

Los efectos de estos gases se deben a su capacidad para inhibir la acción de la acetilcolinesterasa<sup>120</sup>. El mal funcionamiento de esta importante enzima del sistema nervioso central, tiene como resultado un aumento en la concentración de la acetilcolina y su posterior acumulación en varios sitios de acción como el cuerpo ciliar del ojo, el árbol bronquial, el tracto gastrointestinal, la vejiga, los vasos sanguíneos, el músculo cardíaco y las terminaciones nerviosas del sistema nervioso simpático que conduce a la parálisis neuromuscular y con el tiempo a la muerte<sup>121,122</sup>. La secuencia de los síntomas varía según la vía de exposición, mientras que los primeros síntomas que aparecen son generalmente los respiratorios, cuando se produce una intoxicación por inhalación, cuando tiene lugar una ingesta del agente tóxico, son los síntomas gastrointestinales los que predominan. La inhibición de la acetilcolina es un proceso progresivo y el grado de inhibición depende no sólo de la concentración del agente nervioso, sino también del tiempo de exposición.

Un ejemplo del uso de estos agentes nerviosos mortales, fue el ataque terrorista en el metro de Tokio que provocó la muerte de una docena de personas. Químicamente los gases nerviosos son ésteres del ácido fosfórico, altamente tóxicos, estructuralmente relacionados con la gran familia de los compuestos organofosforados. La Segunda Guerra Mundial fue el escenario donde se desarrollaron gases como el Tabún (GA), el Sarín (GB) y el Somán (GD). Investigaciones posteriores dieron lugar al descubrimiento de nuevos tipos de agentes nerviosos. Estos agentes son los conocidos como agentes nerviosos serie V (VG, VM, VX, VE), siendo estos aún más venenosos que el sarín. Debido a la alta toxicidad de agentes nerviosos, se han utilizado compuestos con estructuras

---

<sup>120</sup> S. M. Somani. Chemical Warfare Agents. Academic Press, San Diego 1992.

<sup>121</sup> T.C. Marrs. Organophosphate poisoning. Pharmacol. Ther. (1993) 58, 51.

<sup>122</sup> F.R. Sidell and J. Borak. Chemical warfare agents: II. Nerve agents. Ann. Emerg. Med. (1992) 21, 865.

químicas similares, como son el diisopropil fluorofosfato (DFP), dietil clorofosfato (DCP) y el dietil cianofosfonato (DCNP). Estos compuestos han sido generalmente utilizados como compuestos modelo para el diseño de sistemas capaces de detectarlos y cuantificarlos, ya que tienen una estructura química similar, pero carecen de la eficacia de los agentes nerviosos típicos, debido a que se hidrolizan fácilmente. La facilidad de producción y la extrema toxicidad de los organofosforados que conforman los agentes nerviosos, subraya la necesidad de detectar estas sustancias químicas. De hecho, se han dirigido grandes esfuerzos al desarrollo de sistemas de detección de estos compuestos que posean una sensibilidad y una selectividad elevadas<sup>123,124</sup>.

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes técnicas empleadas en la detección de estos agentes. Su detección en el aire se basa principalmente en empleo de la Espectroscopía de movilidad iónica. Además, se han desarrollado una gran variedad de métodos de detección de agentes nerviosos y de otros agentes de armas químicas mediante el uso de diferentes técnicas como son: dispositivos basados en superficies de onda acústicas (SAW)<sup>125,126,127,128</sup>, ensayos enzimáticos<sup>129,130</sup>, dispositivos basados en métodos

---

<sup>123</sup> H. H. Hill, S. J. Martin. Conventional analytical methods for chemical warfare agents. *Pure Appl. Chem.* (2002) 74, 2281.

<sup>124</sup> L. M. Eubanks, T. J. Dickerson, K. D. Janda. Technological advancements for the detection and protection against biological and chemical warfare agents. *Chem. Soc. Rev.* (2007) 36, 458.

<sup>125</sup> B. S. Joo, J. S. Huh, D. D. Lee. Fabrication of polymer SAW sensor array to classify chemical warfare agents. *Sens. Actuators B: Chem* (2007) 121, 47.

<sup>126</sup> T. Alizadeh, S. Zeynali. Electronic nose based on the polymer coated SAW sensors array for the warfare agent simulants classification *Sens. Actuators B: Chem* (2008) 129, 412.

<sup>127</sup> X. Du, Z. Ying, Y. Jiang, Z. Liu, T. Yang, G. Xie. Synthesis and evaluation of a new polysiloxane as SAW sensor coatings for DMMP detection *Sens. Actuators B: Chem* (2008) 134, 409.

<sup>128</sup> A. T. Nimal, U. Mittal, M. Singh, M. Khaneja, G. K. Kannan, J. C. Kapoor, V. Dubey, P.K. Gutch, G. Lal, K.D. Vyas, D.C. Gupta. Development of handheld SAW vapor sensors for explosives and CW agents. *Sens. Actuators B: Chem* (2009) 135, 399.

electroquímicos<sup>131,132,133,134,135,136,137</sup>, la interferometría<sup>138</sup>, la cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas<sup>139</sup>, y sondas cromofluorogénicas<sup>140,141,142,143</sup>. A pesar de que a priori, estos métodos parecen

---

<sup>129</sup> A. J. Russel, J. A. Berberich, G. F. Drevon, R. R. Koepsel. Biomaterials for mediation of chemical and biological warfare agents. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* (2003) 5, 1.

<sup>130</sup> M. Wheelis. Biotechnology and chemical weapons control. *Pure Appl. Chem.* (2002) 74, 2247.

<sup>131</sup> Y. Lin, F. Lu, J. Wang. Disposable carbon nanotube modified screen-printed biosensor for amperometric detection of organophosphorus pesticides and nerve agents. *Electroanal.* (2004) 16, 145.

<sup>132</sup> J. Wang. Microchip devices for detecting terrorist weapons. *Anal. Chim. Acta* (2004) 507, 3.

<sup>133</sup> M. H. Hammond, K. J. Johnson, S. L. Rose-Pehrsson, J. Ziegler, H. Walker, K. Coudy, D. Gary, D. Tillett. A novel chemical detector using cermet sensors and pattern recognition methods for toxic industrial chemicals. *Sens. Actuators B: Chem* (2006) 116, 135.

<sup>134</sup> K. Anitha, S. V. Mohan, S. J. Reddy. Development of acetylcholinesterase silica sol-gel immobilized biosensor—an application towards oxydemeton methyl detection. *Biosens. Bioelectron.* (2004) 20, 848.

<sup>135</sup> A. L. Simonian, J. K. Grimsley, A. W. Flounders, J. S. Schoeniger, C. T. Cheng, J. J. De Frank, J. R. Wild. Enzyme-based biosensor for the direct detection of fluorine-containing organophosphates. *Anal. Chim. Acta* (2001) 442, 15.

<sup>136</sup> D. Yu, J. Volponi, S. Chhabra, C. J. Brinker, A. Mulchandani, A. K. Singh. Aqueous sol-gel encapsulation of genetically engineered *Moraxella* spp. cells for the detection of organophosphates. *Biosens. Bioelectron.* (2005) 20, 1433.

<sup>137</sup> Y. Zhou, B. Yu, E. Shiu, K. Levon. Potentiometric sensing of chemical warfare agents: surface imprinted polymer integrated with an Indium tin oxide electrode. *Anal. Chem.* (2004) 76, 2689.

<sup>138</sup> H. Sohn, S. Letant, M. J. Sailor, W. C. Trogler. Detection of fluorophosphonate chemical warfare agents by catalytic hydrolysis with a porous silicon interferometer. *J. Am. Chem. Soc.* (2000) 122, 5399.

<sup>139</sup> W. E. Steiner, S. J. Klopsch, W. A. English, B. H. Clowers, H. H. Hill. Detection of a chemical warfare agent simulant in various aerosol matrixes by ion mobility time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* (2005) 77, 4792.

<sup>140</sup> S. Royo, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, A. M. Costero, M. Parra, S. Gil. Chromogenic and fluorogenic reagents for chemical warfare nerve agents' detection. *Chem. Commun.* (2007) 46, 4839.

<sup>141</sup> A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, P. M. E. Mancini, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, S. Royo. Chromogenic detection of nerve agent mimics. *Chem. Commun.* (2008) 45, 6002.

<sup>142</sup> B. C. Giordano, G. E. Collins. Synthetic methods applied to the detection of chemical warfare nerve agents. *Curr. Org. Chem.* (2007) 11, 255.

adecuados para la detección de los agentes nerviosos, en la práctica presentan ciertas limitaciones tales como, la falta de especificidad, selectividad limitada, la complejidad operativa, la no transferibilidad, las dificultades de control en tiempo real y la presencia de falsos positivos.

Siguiendo con nuestro interés en el desarrollo de nuevos sistemas de sensores<sup>144,145,146</sup>, se presenta en este capítulo, una metodología que permite la detección de simulantes de agentes nerviosos en disolución acuosa, mediante el uso de una lengua electrónica simple, basada en la voltametría de pulsos. En la literatura podemos encontrar algunos ejemplos de narices electrónicas<sup>147,148,149,150,151</sup> y del empleo de sensores SAW, utilizados para la detección de estos agentes de guerra química en fase gaseosa. Sin embargo, el uso de lenguas electrónicas para la detección de estos compuestos es un campo

---

<sup>143</sup> M. Burnworth, S. J. Rowan, C. Werder. Fluorescent sensors for the detection of chemical warfare agents. *Chem. Eur. J.* (2007) 13, 7828.

<sup>144</sup> J. Soto, R. H. Labrador, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, C. Coll, E. García-Breijo, L. Gil. A model for the assessment of interfering processes in Faradic electrodes. *Sens. Actuators A: Phys* (2008) 142, 56.

<sup>145</sup> R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. García-Breijo, L. Gil, J. Ibáñez, E. Gadea. A multisensor in thick-film technology for water quality control. *Sens. Actuators A: Phys* (2005) 120, 589.

<sup>146</sup> R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. García-Breijo, L. Gil, J. Ibáñez, E. Llobet. An "electronic tongue" design for the qualitative analysis of natural waters. *Sens. Actuators B: Chem* (2005) 104, 302.

<sup>147</sup> B. C. Giordano, G. E. Collins. Synthetic methods applied to the detection of chemical warfare nerve agents. *Curr. Org. Chem.* (2007) 11, 255.

<sup>148</sup> N. J. Choi, J. H. Kwak, Y. T. Lim, T. H. Bahn, K. Y. Yun, J. C. Kim, J. S. Huh, D. D. Lee. Classification of chemical warfare agents using thick film gas sensor array. *Sens. Actuators B: Chem* (2005) 108, 298.

<sup>149</sup> E. Brunol, F. Berger, M. Fromm, R. Planade. Detection of dimethyl methylphosphonate (DMMP) by tin dioxide-based gas sensor: Response curve and understanding of the reactional mechanism. *Sens. Actuators B: Chem* (2006) 120, 35.

<sup>150</sup> W. Caihong, X. Chu, M. Wu. Highly sensitive gas sensors based on hollow SnO<sub>2</sub> spheres prepared by carbon sphere template method. *Sens. Actuators B: Chem* (2007) 120, 508.

<sup>151</sup> S. C. Lee, H. Y. Choi, S. J. Lee, W. S. Lee, J. S. Huh, D. D. Lee, J. C. Kim. The development of SnO<sub>2</sub>-based recoverable gas sensors for the detection of DMMP. *Sens. Actuators B: Chem* (2009) 137, 239.

poco estudiado y esta circunstancia ha sido uno de los motivos del desarrollo del presente trabajo.

## **3.2. Experimental.**

### **3.2.1. Preparación de muestras.**

En este trabajo se han llevado a cabo dos tipos de experimentos: experiencias de discriminación de muestras y experiencias de cuantificación, mediante la predicción de los niveles de concentración. Para los estudios de discriminación se utilizaron los simulantes de los agentes nerviosos, dietil clorofosfato (DCP) y dietil cianofosfonato (DCNP) y un conjunto de seis derivados organofosforados con estructura química similar que son, dietil (1-feniletil) fosfonato (OP-1), dietil (metiltiometil) fosfonato (OP-2), dietil (2-cianoetil) fosfonato (OP-3), dietil metil fosfonato (OP-4), trietil fosfafonato (OP-5) y dietil-(2-oxopropil) fosfonato (OP-6) todos ellos con una concentración de  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  usando como disolvente una disolución de ácido N-[2-hidroxiethyl] piperacin-N'-[2-etanosulfónico] (HEPES) con una concentración de  $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 7. Cada muestra fue medida 5 veces y las respuestas obtenidas fueron sometidas a un análisis por componentes principales (PCA). La Figura 3.1 muestra las estructuras químicas de los compuestos utilizados para estos estudios



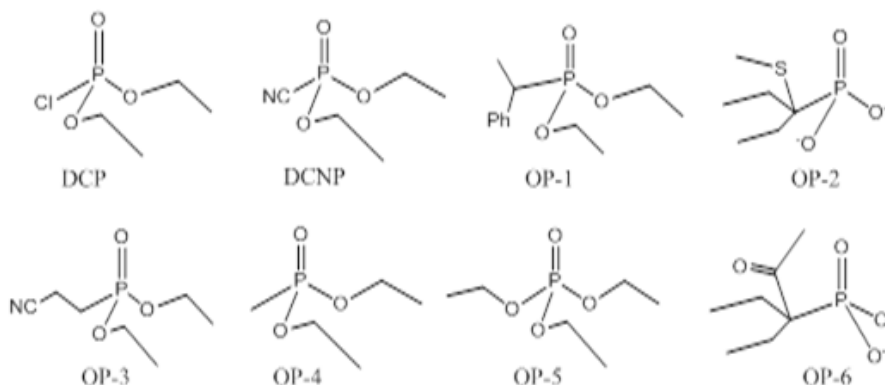


Figura 3.1. Estructura química de los simulantes de guerra y otros organofosforados.

En los análisis cuantitativos se estudiaron los simulantes (DCP y DCNP) y un tercer organofosforado (OP-2) con el objetivo de comprobar la capacidad predictiva de la lengua electrónica en mezclas multicomponentes, así como de contrarrestar o disminuir la correlación de las señales de los electrodos para cada componente químico. Para ello se preparó un sistema de tres componentes/tres niveles de concentración mediante la utilización de un diseño experimental llevado a cabo con el software MODDE 8.0, Umetrics.

Este diseño experimental estableció la cantidad de muestras necesarias para el calibrado del sistema, así como los niveles de los tres componentes en cada una de ellas, de tal forma que la mayor parte de la información del sistema quedara incluida, pero a la vez resumida correctamente. Con todo ello, se preparó un total de 19 muestras patrones, que incluían los niveles bajo, medio y alto de cada elemento en cada muestra, según el diseño experimental. El nivel bajo hace referencia a una concentración de  $10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , el nivel medio equivale a una concentración de  $5 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  y el nivel alto se corresponde con una concentración de  $10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Todas las disoluciones preparadas se tamponaron a pH 7. Una muestra adicional de concentración 0-0-0, es decir sin ningún agente

activo, se utilizó en este estudio, con el fin de conocer el comportamiento del disolvente. En la Tabla 3.1 se representa el diseño experimental realizado, donde se puede observar la concentración de cada componente en cada disolución patrón.

Tabla 3.1. Composición de las disoluciones de los compuestos seleccionados.

	DCP	DCNP	OP-2
Muestra	$(\text{mol dm}^{-3}) \times 10^{-4}$	$(\text{mol dm}^{-3}) \times 10^{-4}$	$(\text{mol dm}^{-3}) \times 10^{-4}$
1	10	10	1
2	1	10	10
3	5	5	5
4	10	1	5
5	1	10	1
6	10	5	10
7	10	10	10
8	10	10	10
9	10	10	10
10	1	1	1
11	1	1	10
12	10	1	10
13	10	10	10
14	1	1	5
15	5	1	10
16	5	1	1
17	10	1	1
18	10	1	10
19	0	0	0

Todas las muestras se midieron en cinco ocasiones con el fin de reducir al mínimo la posibilidad de error debido a la memoria de los electrodos. En estos estudios, los compuestos DCP y DCNP fueron seleccionados como agentes simulantes de los gases nerviosos, mientras que el compuesto OP-2 fue seleccionado debido a que es un derivado organofosforado "no tóxico".

### 3.2.2. Principio y procedimiento de medida.

El dispositivo de lengua electrónica se compone de una serie de ocho electrodos de trabajo formado por varillas de distinto metales: Au, Pt, Ir, Rh, Cu, Co, Ni y Ag<sup>152,153,154</sup>. En este caso los cilindros de acero inoxidable actuaron como contraelectrodo y como pseudo-referencia. Los pulsos de potencial se han sido generados por el primer prototipo diseñado en el IDM (ver capítulo 1)<sup>155</sup>.

Las medidas se llevaron a cabo mediante la aplicación de un total de 32 pulsos de potencial fijo sobre los electrodos de trabajo, con un rango que varía entre + 0.5 y -0.5 V frente al contraelectrodo y con una duración de 40 ms. Cada muestra se midió por quintuplicado. Después de cada medida, la superficie de los electrodos fue regenerada mediante un proceso de pulido mecánico, el cual

---

<sup>152</sup> R. H. Labrador, J. Olsson, F. Winqvist, R. Martínez-Máñez, J. Soto. Determination of bisulfites in wines with an electronic tongue based on pulse voltammetry. *Electroanal.* (2009) 21, 612.

<sup>153</sup> S. Holmin, P. Spangeus, C. Krantz-Rulcker, F. Winqvist. Compression of electronic tongue data based on voltammetry — a comparative study. *Sens. Actuators B: Chem* (2001) 76, 455.

<sup>154</sup> A. Gutiérrez, F. Céspedes, M. Valle, D. Louthander, C. Krantz-Rulcker, F. Winqvist. A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters. *Sens. Actuators B: Chem* (2006) 115, 390.

<sup>155</sup> R. Masot. Tesis Doctoral: Desarrollo de un sistema de medida basado en espectroscopia de impedancia para la determinación de parámetros fisicoquímicos en alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. (2010).

ofrece una superficie limpia y sin rayas, que es de elevada importancia a la hora de realizar cualquier estudio con la lengua electrónica<sup>156</sup>.

La duración de cada pulso fue de 40 ms y se registraron 8 puntos por pulso de manera uniforme durante ese tiempo. El número total de puntos que definen la onda de cada medida fue de 2048 (32 pulsos X 8 electrodos x 8 puntos/pulso).

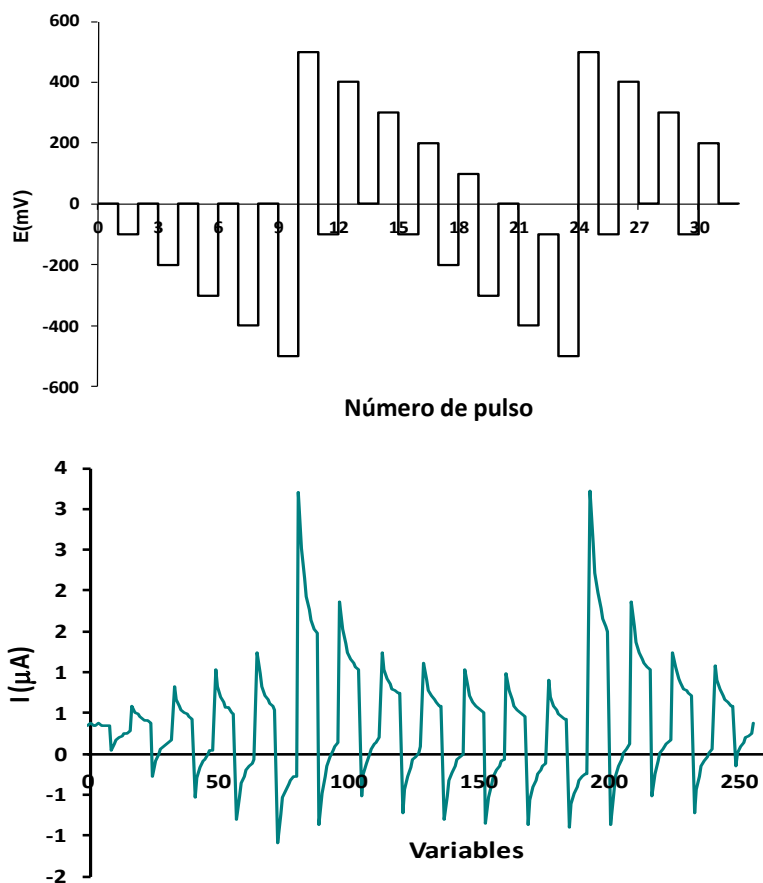


Figura 3.2. Tren de pulsos aplicado a la lengua electrónica (arriba), y respuesta de la intensidad de corriente obtenida (abajo) para una muestra que contiene  $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  de DCP,  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  de DCNP y  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  de OP-2.

<sup>156</sup> J. Olsson, F. Winqvist, I. Lundstrom. A self-polishing electronic tongue. Sens. Actuators B: Chem (2006) 118, 461.

En la Figura 3.2, se pueden observar la secuencia de pulsos aplicado a la lengua electrónica (arriba) y respuesta de la corriente obtenida (abajo) para una mezcla de  $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  de DCP,  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  de DCNP y  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  de OP-2.

### 3.2.3. Tratamiento de los datos.

Con el fin de analizar los datos obtenidos con la lengua electrónica voltamétrica, se han utilizado varias técnicas de análisis multivariado. En primer lugar, se llevó a cabo una clasificación de las muestras, aplicando a las respuestas obtenidas un análisis de componentes principales (PCA), y una clasificación con redes neuronales artificiales utilizando el algoritmo fuzzy ARTMAP<sup>157,158</sup>. Esta red neuronal por lo general funciona muy bien cuando hay muy pocas muestras de entrenamiento o calibración. Por último, para los ensayos de cuantificación, se utilizó la técnica de regresión de mínimos cuadrados parciales con el fin de obtener los modelos de predicción de cada uno de los compuestos estudiados según las respuestas de intensidad de corriente obtenidas en el proceso de calibración (Matriz X) y los valores conocidos de concentración de cada anión en cada muestra (Matriz Y). Previo a la creación del modelo, se realizó una validación cruzada de los datos, con el objetivo de evaluar los datos experimentales y extraer además el número óptimo de variables latentes que se deben de utilizar en la creación de los modelos de predicción. Una vez se crearon los modelos de predicción, la capacidad predictiva, relativa a la exactitud y precisión del modelo

---

<sup>157</sup> G. Carpenter, S. Grossberg, N. Markuzon, J. Reynolds, D. Rosen. Fuzzy ARTMAP: A neural network architecture for incremental supervised learning of multidimensional maps. IEEE Trans. Neural Netw. (1992) 3 698.

<sup>158</sup> G.A. Carpenter, S. Grossberg, Fuzzy ARTMAP: a synthesis of neural networks and fuzzy logic for supervised categorization and nonstationary prediction, in: R.R. Yager, L.A. Zadeh (Eds.), Fuzzy Sets, Neural Networks, and Soft Computing, Van Nostrand-Reinhold, New York (1994) 126.

se evaluó mediante el análisis de los parámetros de ajuste lineal de los valores predichos experimentales ( $p_1$ ,  $p_2$ , NR). Todos tratamientos estadísticos que se describen en este trabajo, se realizaron con el software Matlab (Versión R2007b, MathWorks) implementado una función macro de las funciones básicas.

### **3.3. Resultados y discusión.**

#### **3.3.1. Estudios voltamperometría.**

Como se mencionó anteriormente, los gases nerviosos son un conjunto de ésteres del ácido fosfórico de muy elevada toxicidad. Son líquidos en condiciones estándar, pero tienen una presión de vapor muy alta, por lo que son fácilmente volatilizables. Además, como líquido también puede ser venenosos si se mezclan con otros líquidos o sólidos como el agua de consumo o los alimentos. Además, estas sustancias químicas son inodoras e incoloras por lo tanto difíciles de detectar a simple vista, al gusto o al olfato.

Con el fin de explorar con más detalle la respuesta de los electrodos metálicos en presencia de los simulantes de agentes nerviosos, se estudió el comportamiento electroquímico de estas especies por voltametría cíclica en medio HEPES  $1 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>, pH 7, como electrolito de fondo), utilizando oro, platino y plata como electrodos de trabajo.

Es conocido, la respuesta voltamétrica de un determinado compuesto estudiado depende de la naturaleza química intrínseca de ambos, por una parte del electrodo y por otra de las características electroquímicas de las especies redox-activas a estudiar. El dispositivo de lengua electrónica se basa en el concepto de que diferencias sutiles entre compuestos relativamente similares, pueden reflejarse en una diferencia específica en la respuesta voltamétrica del conjunto

de los electrodos. Así, por ejemplo, la respuesta transitoria de los electrodos, depende de los procesos redox que tienen lugar en la superficie de estos, pero también depende de los coeficientes de difusión, de los fenómenos de doble capa eléctrica, etc.

Para realizar los estudios de voltametría cíclica se prepararon disoluciones acuosas de concentración  $0.005 \text{ mol dm}^{-3}$  de los distintos gases simulantes (DCP, DCNP y DMMP), todas ellas tamponadas en HEPES a pH 7 con una concentración de  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Las medidas de voltametría cíclica se realizaron usando el equipo Autolab PGSTAT100. La ventana electroquímica, dentro de la cual se realizaron dichas medidas fue configurada de la siguiente manera: para los electrodos Pt, Rh, Ir y Au comprendía el rango de potenciales que iba desde -0.9 a 0.8 V. Para los electrodos no nobles, Cu, Ag, Ni y Co, la ventana se acortó debido a los procesos de corrosión que sufren estos metales cuando se someten a potenciales de oxidación elevados. En este caso la ventana electroquímica usada estuvo comprendida en un rango de -1.25 a 0.6 V. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y con una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

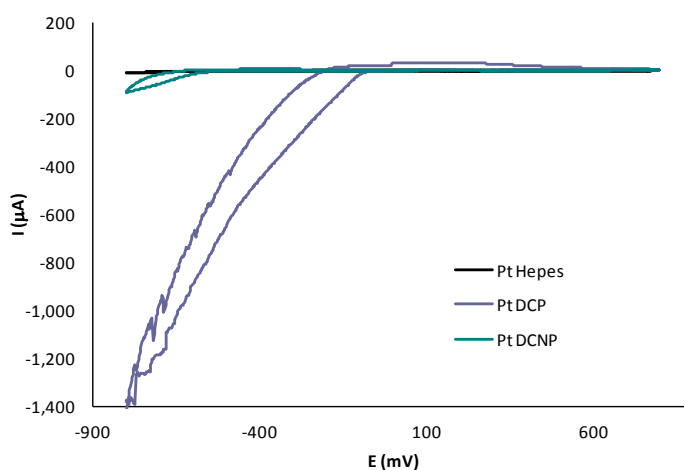


Figura 3.3. Voltagrama cíclico Pt .

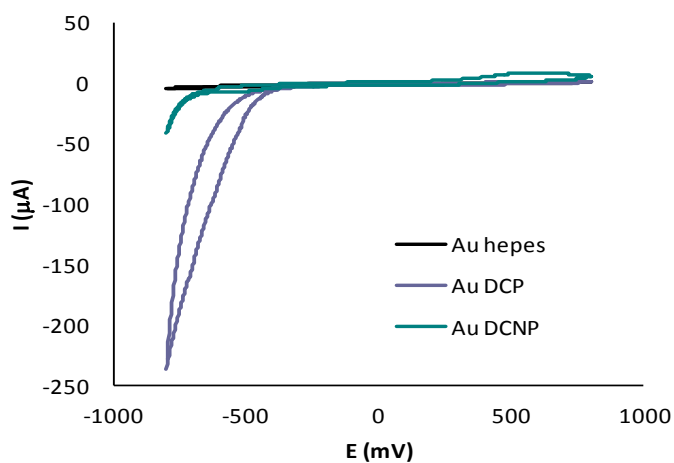


Figura 3.4. Voltagrama cíclico Au.

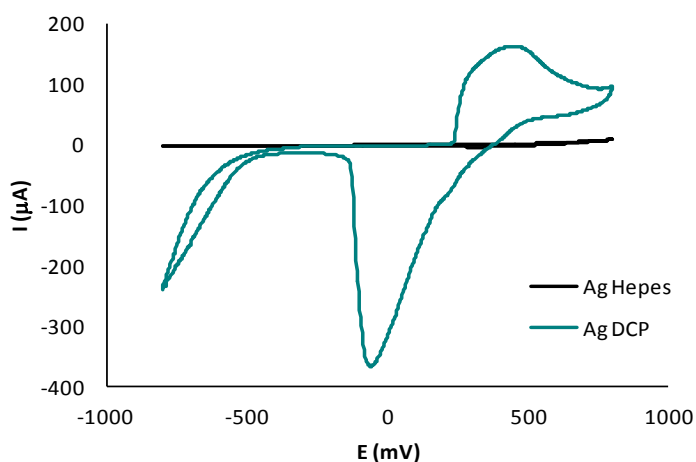


Figura 3.5. Voltagrama cíclico Ag .

Como muestran las Figuras 3.3 y 3.4, los estudios de voltametría de ambos compuestos, DCP y DCNP, muestran un pico de reducción irreversible, mal definido en un rango de potencial que va desde -0.50 a -0.70 V frente al SCE , cuando se utilizan como electrodos de trabajo Pt y Au. Además, el DCNP muestra



sobre el electrodo de oro un proceso de oxidación irreversible a +0.55 V frente al SCE. Si se observa la Figura 3.5, se encuentran cambios más relevantes cuando se utilizó la plata como electrodo de trabajo, especialmente en presencia de DCP. En este caso, el barrido de potencial anódico dio lugar a un proceso de oxidación irreversible a +0.30 V frente al SCE. Cuando se invierte el barrido, se produce la reducción del compuesto formado a -0.1 V.

Estos datos sugieren que las lenguas electrónicas voltamétricas pueden ser adecuadas para la detección de estos productos químicos mortales en agua. Además, hay que tener en cuenta que en los últimos años, se han descrito estudios que señalan, que la falta de procesos redox específicos, no impide el uso de estos dispositivos. El uso de análisis de datos multivariados, proporcionan a estos dispositivos la oportunidad de detectar el cambio producido por las especies químicas en disolución, en las intensidades de corrientes de oxidación y reducción del agua, así como los cambios en el potencial de equilibrio de los electrodos, o la presencia de efectos no farádicos debidos a la absorción de los compuestos químicos sobre la superficie de los metales<sup>159</sup>.

Además, hay que tener en cuenta que existen importantes diferencias entre los datos obtenidos a partir de voltametría cíclica y los obtenidos a partir de las electrónicas voltamétricas utilizadas en este estudio. Mientras que las técnicas tradicionales sólo miden la corriente farádica al final de cada pulso, con la técnica que aquí presentamos, la intensidad de corriente se mide de manera continua, es decir, en función del tiempo.

---

<sup>159</sup> J. Olsson, P. Ivarsson, F. Winquist. Determination of detergents in washing machine wastewater with a voltammetric electronic tongue. *Talanta* (2008) 76, 91.

### 3.3.2. Formación de clústers mediante PCA.

Como se indicó anteriormente, para llevar a cabo los estudios de clasificación, y con el fin de mostrar la capacidad de clasificación de la lengua electrónica hacia los derivados organofosforados (ver Figura 3.1), se prepararon 8 muestras de los compuestos: DCP, DCNP y OP-1 al OP-6. Las diferentes respuestas electroquímicas se combinaron, para formar patrones de reconocimiento, con el fin de encontrar una huella característica para cada muestra.

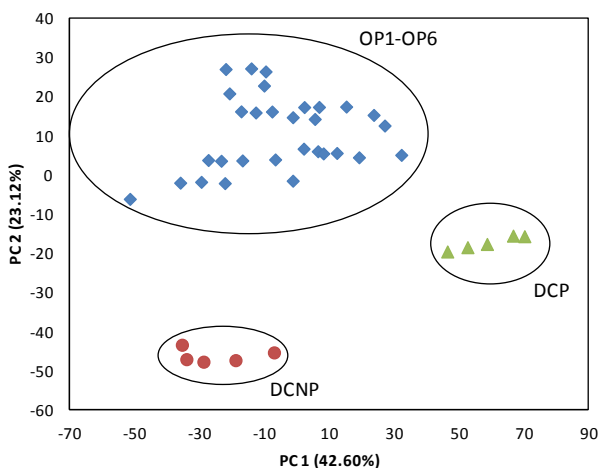


Figura 3.6. Gráfico de PCA para los diferentes simulantes de agentes nerviosos que se muestran en la Figura 3.1.

La Figura 3.6, muestra el gráfico de scores obtenido para el conjunto de las respuestas de los 8 compuestos que se muestran en el esquema 3.1, cuando se miden 5 veces, lo que proporciona un número total de 40 puntos. Como se puede observar, las muestras correspondientes a los simulantes de los agentes nerviosos, DCP y DCNP aparecen bien separadas entre ellas y del resto, mientras que el resto de derivados OP, aparecen en la misma zona del gráfico de scores, formando todos ellos un único clúster. Este es un resultado prometedor, que sugiere que la respuesta diferencial en la técnica de voltametría utilizando un conjunto de electrodos puede ser un método adecuado para la detección de

agentes neurotóxicos en muestras acuosas. Con el fin de estudiar la reproducibilidad del sistema, el estudio se repitió transcurrido un mes, y se obtuvo una gráfica de PCA muy similar al presentado anteriormente. Esta reproducibilidad es debida muy probablemente al procedimiento de pulido que se lleva a cabo entre medida y medida, el cual permite la regeneración de la superficie del electrodo metálico evitando así el envenenamiento del mismo.

### **3.3.3. Clasificación mediante redes neuronales artificiales.**

El gráfico de análisis de PCA representa un total del 68.25% ( $PC1=43.81\%$  y  $PC2=25.44\%$ ) de la información proporcionada por todas las medidas de los ocho electrodos. Por lo tanto, es recomendable realizar un análisis cuantitativo para la discriminación de las muestras con el fin de determinar si el dispositivo de lengua electrónica es capaz de clasificar las muestras de una manera adecuada. Con este objetivo, los datos obtenidos fueron analizados utilizando redes neuronales artificiales. Estas redes utilizan el conjunto de medidas para una primera etapa de entrenamiento, y posteriormente las someten a una nueva fase de validación. El objetivo de este tratamiento, es la clasificación de cada muestra de acuerdo con el tipo de muestra. El tipo de redes neuronales artificiales utilizadas fue fuzzy ARTMAP. Este tipo de red, pertenece a un conjunto de redes neuronales que se basan en la teoría de la adaptación de resonancia, como estructuras que implementan una etapa de aprendizaje supervisado y una posterior clasificación de los vectores multidimensionales en una serie de categorías de salida<sup>160</sup>. Estas redes neuronales permiten

---

<sup>160</sup> E. Llobet, E. L. Hines, J.W. Gardner, P. N. Bartlett, T. T. Mottram. Fuzzy ARTMAP based electronic nose data analysis. *Sens. Actuators B: Chem* (1999) 61, 183.

generalmente un entrenamiento rápido y eficiente, incluso cuando hay un número de muestras de entrenamiento diferente dentro de cada categoría<sup>161</sup>.

Para este trabajo se han empleado dos tipos de redes neuronales. Una de ellas tiene implementadas 8 salidas que se corresponden con cada uno de los de 8 organofosforados (ver Figura 3.1), y una segunda red con un número menor de salidas. En esta segunda red, los compuestos a estudiar se distribuyeron en tres grupos correspondientes a DCP, DNCP y un tercer grupo que engloba el resto de organofosforados (de OP-1 a OP-6). La razón de esta clasificación se deriva de resultados de los estudios de PCA, en los que se observa una distribución clara de estos tres grupos en el gráfico de resultados (ver Figura 3.6). Para estimar la tasa de éxito en la identificación de las muestras con cada una de las redes aplicadas, a las 40 muestras de partida se les aplicó un método de validación cruzada de orden uno, llamado "leave-one-out". Este método se utiliza cuando el número de muestras es reducido y el número de clases a obtener es elevado. En este caso, el método de "leave-one-out", es un método que se ve menos influenciados por el azar, que los demás procedimientos. Esta técnica se ha utilizado en muchos trabajos científicos relacionados con las narices y las lenguas electrónicas en otras aplicaciones. Entonces, la medida restante fue introducida en la red para comprobar si la esta era capaz de clasificar la medida excluida dentro del grupo al que pertenecía.

---

<sup>161</sup> G. Carpenter, S. Grossberg, N. Markuzon, J. Reynolds, D. Rosen. IEEE Trans. Neural Networks (1992) 3, 698.

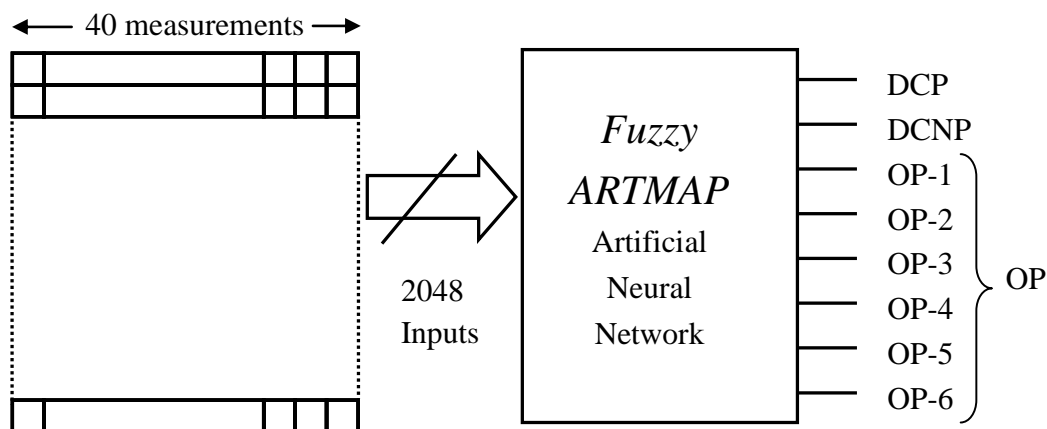


Figura 3.7. Esquema de entradas y salidas de la red neuronal.

Un total de 40 validaciones se llevaron a cabo, cambiando cada vez la medida que se sometió al proceso de validación. Con todos estos cálculos, se obtuvo la tasa de éxito del 100%, tanto para la red con 8 salidas, como para la red de 3 salidas. En este trabajo se ha utilizado una red neuronal artificial como un complemento del análisis de PCA, ya que los gráficos de los dos primeros PC (PC1 y PC2) sólo ofrecían un 68.25% del total de información disponible para los 8 electrodos.

### 3.3.4. Análisis cuantitativo mediante PLS.

Alentados por los resultados observados en cuanto a la clasificación de los agentes nerviosos en ambientes acuosos, hemos completado nuestro estudio mediante el uso de mínimos cuadrados parciales (PLS), en un intento de establecer una correlación entre las medidas voltamétricas y la concentración de DCP y DCNP en solución acuosa. Los modelos de predicción obtenidos mediante la

herramienta PLS1 (analizado cada una de las variables por separado)<sup>162</sup> para el DCP y DCNP, se han creado con los datos experimentales recogidos de la respuesta de los sensores en disolución. En una etapa de pre-procesado de los datos, se realizó la media de las 5 medidas para cada muestra, obteniendo un número final de muestras de 19. El número de variables latentes en PLS es un parámetro del procedimiento, cuyo valor se estima a partir de los datos de calibración. De acuerdo con los estudios de validación cruzada calculada empleando el método de “leave-one-out”, se han utilizado 8 variables latentes se para el cálculo de los modelos de predicción del DCP y del DCNP.

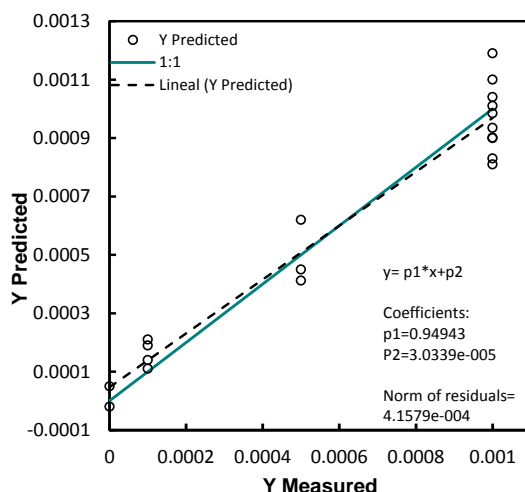


Figura 3.8. Gráfico de PLS para el DCP en agua.

<sup>162</sup> A. A. Tomchenko, G. P. Harmer, B. T. Marquis. Detection of chemical warfare agents using nanostructured metal oxide sensors. Sens. Actuators B: Chem (2005) 108, 41.

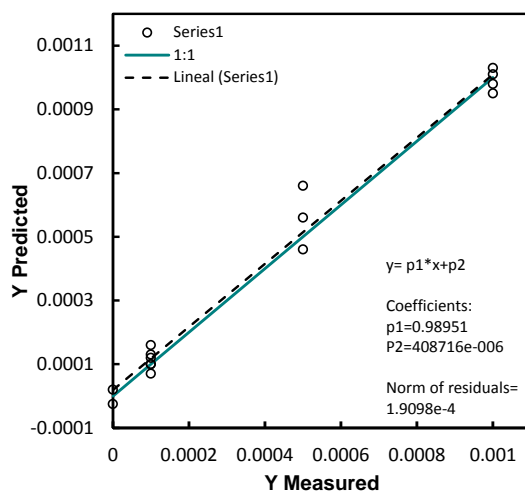


Figura 3.9. Gráfico de PLS para el DCNP en agua.

Las Figuras 3.8 y 3.9, muestran los valores predichos por el modelo frente a la concentración real de DCP y DCNP. Una predicción ideal supondría que los puntos de la gráfica se distribuyeran a lo largo de la línea diagonal 1:1, ya que ambos, los datos reales y los predichos deberían ser los mismos. Si se observa la gráfica, se puede comprobar que la mayoría de los puntos se distribuyen a lo largo de la línea de ajuste, por lo que se puede decir que la predicción de ambos simulantes es precisa y exacta, siendo un poco mejor el modelo obtenido para el DCNP.

Tabla 3.2. Parámetros de ajuste de los modelos de predicción para DCP y DCNP.

	p1 (pendiente)	p2 (ordenada en el origen)	NR
DCP	0.9494	$3.03 \times 10^{-5}$	$4.15 \times 10^{-4}$
DCNP	0.9895	$4.87 \times 10^{-6}$	$1.90 \times 10^{-4}$

Los resultados de los estudios de PLS1 se resumen en la Tabla 2.2. El ajuste lineal que se muestran en las figuras, se calculó utilizando un modelo lineal descrito por  $y=p_1 \cdot x+p_2$ , donde  $p_1$  es la pendiente de la curva de ajuste y  $p_2$  la ordenada en el origen. En el análisis de PLS1, cuanto más cercano sea el valor de la pendiente a 1 y el de la ordenada en el origen a 0, más exacto es el modelo obtenido. Además en la Tabla 2.2, también se muestra el parámetro NR o residuales normalizados, que representa la bondad del ajuste. Este parámetro es una herramienta útil para evaluar la precisión de las predicciones. Las primeras conclusiones obtenidas tras examinar visualmente las gráficas de PLS1, se pueden confirmar examinando los valores de los parámetros de ajuste obtenidos. Se comprueba que en ambos casos el modelo es exacto, con un valor de pendiente cercano a la unidad, 0.9494 para DCP y 0.9895 para el DCNP, y exacto con valores de NR de  $4.15 \times 10^{-4}$  y  $1.90 \times 10^{-4}$ , respectivamente.



### **3.4. Conclusiones.**

En este capítulo se propone un método para la detección de simulantes de guerra química, mediante el uso de una lengua electrónica y el empleo de electrodos metálicos simples.

El análisis PCA muestra que es posible detectar la presencia de los simulantes de agente nerviosos, DCP y DCNP en agua, y discriminar su respuesta frente a la respuesta de otros derivados organofosforados similares, y comprobada mediante el uso de redes neuronales, concretamente la red neuronal difusa ARTMAP.

Por último, el análisis de los datos usando la herramienta de análisis PLS1, permitió cuantificar las concentraciones de un sistema formado por 3 compuestos (DCP, DCNP y OP-2) con 3 niveles de concentración en agua.

Estos estudios preliminares, sugieren que este sistema de lenguas electrónicas voltamétricas, o uno similar, pueden ser utilizados para detectar concentraciones moderadas de agentes nerviosos en ambientes acuosos.



### 3.5. Conclusions.

In this chapter, a method for the chemical detection of nerve agent mimics, by means of the use of an electronic tongue based on the use of simple metallic electrodes has been developed.

The PCA analysis shows that it is possible to detect the presence of nerve agent mimics like DCP and DCNP in water and to discriminate their responses from other similar organophosphorous derivatives. This discrimination and recognition was confirmed using classifications procedures with artificial neural networks.

The type of artificial neural network used was fuzzy ARTMAP. To estimate the rate of success in the identification of the samples with each type of classifier, leave-one-out cross-validation method was applied using the 40 measurements available. A remarkable rate of success of 100% was achieved for the discrimination of DCP, DCNP and other organophosphorous-derivatives.

Finally, PLS1 data analysis using three compounds (DCP, DCNP and OP-2)/3 concentration levels system shows a good accuracy in concentration prediction for DCP and DCNP in water. These preliminary data suggest that this or similar voltammetric tongues could be used to detect moderate concentrations of nerve agent mimics in aqueous environments or in food samples.



## **Capítulo 4:**

# **Determinación de la concentración de los aniones nitrato, nitrito y cloruro en carne picada**



## 4.1. Introducción.

El uso de los agentes de curado nitrito y nitrato en el procesado de la carne ha sido un tema controvertido desde la década de 1970. Debido a preocupaciones toxicológicas deben sopesarse los beneficios de los agentes de curado a la apariencia, el sabor, la estabilidad y la seguridad de los productos cárnicos. En los últimos años se ha registrado un aumento en la demanda de carnes con menos aditivos. El Reglamento (CE) 780/2006 (la modificación del Reglamento (CE) n.º 2092/91) sólo permite el uso de nitritos y nitratos en niveles reducidos y sólo si “no está disponible una alternativa tecnológica que ofrezca las mismas garantías sanitarias y / o que permitan mantener las características del producto”.

Aunque la conservación de la mayoría de los productos cárnicos se puede hacer mediante la combinación de métodos físicos y químicos, el proceso de salazón, curado y secado es una de las combinaciones más frecuentes en la industria cárnica española, que dan productos como el jamón y el lomo. Antes o simultáneamente a la fase de salazón, por lo general, se lleva a cabo un proceso de nitrificación por la adición de nitritos, nitratos o ambos, que se suman con el objetivo de dar una coloración roja al producto, así como para inhibir el crecimiento microbiano<sup>163</sup>. El mecanismo de la formación del color durante el proceso de curado es bien conocido y ha sido recientemente publicado por Honikel<sup>164</sup>. Dado que los consumidores asocian el color rosa de producto cárnico con la “frescura”, la comercialización de carnes de color grisáceo es

---

<sup>163</sup> N.G. Marriott, P.P. Graham, C.K. Shaffer, S.K. Phelps. Accelerated production of dry cured hams. *Meat Sci.* (1987) 19, 53.

<sup>164</sup> K.O. Honikel, The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.* (2008) 78, 68.

difícil<sup>165</sup>. Además, el conocido efecto de los nitritos en el sabor de las carnes curadas se debe principalmente a su capacidad para unirse a  $\text{Fe}^{2+}$ . De esta forma, el hierro no puede iniciar los cambios oxidativos de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en los lípidos.

La legislación europea sobre aditivos alimentarios (Directiva 2006/52/CE) clasifica a los agentes de curado como conservantes, es decir, compuestos que inhiben los microorganismos. Por ejemplo, los nitritos impiden la proliferación de las indeseables bacterias Gram-negativas en las primeras etapas de la fermentación de embutidos<sup>166,167</sup> y, posiblemente, la *Listeria monocytogenes*<sup>168</sup>. Por otra parte, Grever y Ruiter<sup>169</sup> y la EFSA<sup>170</sup> señalaron que el efecto antimicrobiano del nitrito depende de muchos factores tales como el pH y los niveles y formas de hierro en el producto. Para una evaluación completa del riesgo, deben tenerse en cuenta las probabilidades de fracaso del proceso, la no detección de productos inseguros durante la distribución y el consumo, así como los datos epidemiológicos y la experiencia industrial. Los datos recientes confirman que el uso de nitritos en

---

<sup>165</sup> F.K. Lücke, Manufacture of meat products without added nitrite or nitrate—quality and safety aspects, in: Proceedings, 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2008, Jelgava, Latvian Agriculture University.

<sup>166</sup> Z. Bern, H. Hechelmann, L. Leistner. The bacteriology of DFD-meat, *Die Fleischwirtsf.* (1976) 56, 985.

<sup>167</sup> Y. Sanz, R. Vila, F. Toldrá, P. Nieto, J. Flores. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *Int. J. Food Microbiol.* (1997) 37, 225.

<sup>168</sup> L.L. Duffy, P.B. Vanderlinde, F.H. Grau. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, nitrite and ascorbate. *Int. J. Food Microbiol.* (1994) 23, 377.

<sup>169</sup> A.B.G. Grever, A. Ruiter, Prevention of *Clostridium* outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite—a review. *Eur. Food Res. Technol.* (2001) 213, 165.

<sup>170</sup> European Food Safety Authority, Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *EFSA J.* (2003) 14, 1.



niveles superiores a 50 mg NaNO<sub>2</sub>/kg producen retrasos en el crecimiento de las bacterias *Clostridium botulinum* en salchichas pasteurizadas a 15 ° C<sup>171</sup>.

Además, se ha comprobado que el efecto del cloruro de sodio, en el tejido de la carne, depende del contenido del mismo<sup>172</sup>. Por ejemplo, la cantidad de “retención” de agua por las proteínas depende de la concentración de sal. Por lo tanto, para las concentraciones de sal entre 45-60 g/L, los tejidos de carne presentan un grado de hinchazón alto<sup>173</sup>, por su parte a una concentración de entre 100-200 g/L, el volumen de la fibra disminuye, debido a que se libera el agua de los tejidos y las proteínas precipitan lo que da lugar los cambios posteriores de la matriz<sup>174</sup>. Debido al importante papel de cloruro de sodio en las características tecnológicas y sensoriales del producto cárnico, se han desarrollado un amplio número de técnicas de medida rápidas y no destructivas<sup>175, 176, 177</sup>.

De acuerdo con la importancia de tener bajo control el uso de cloruro de sodio y las sales nitrificantes en los productos derivados de la carne, nuestro objetivo es proponer un método rápido, sencillo y de bajo costo para la detección de los

---

<sup>171</sup> Z. Bern, H. Hechelmann, L. Leistner. The bacteriology of DFD-meat, *Die Fleischwrtsh.* (1976) 56, 985.

<sup>172</sup> J. Ruiz-Ramírez, J. Arnau, X. Serra, P. Gou. Relationship between water content, NaCl content, pH and texture parameters in dry-cured muscles. *Meat Sci.* (2005) 70, 579.

<sup>173</sup> G Offer, J. Trinick. On the mechanism of water holding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Sci.* (1983) 8, 245.

<sup>174</sup> J. Arnau, X. Serra, J. Comaposada, P. Gou, M. Garriga. Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Sci.* (2007) 77, 81.

<sup>175</sup> E. García-Breijo, J.M. Barat, O.L. Torres, R. Grau, L. Gil, J. Ibáñez, M. Alcañiz, R. Masot, R. Fraile. Development of a puncture electronic device for electrical conductivity measurements throughout meat salting. *Sens. Actuators A: Phys.* (2008) 148, 63.

<sup>176</sup> H.C. Bertram, S.B. Engelsens, H. Busk, A.H. Karlsson, H.J. Andersen. Water properties during cooking of pork studied by low-field NMR relaxation: effects of curing and the RN-gene. *Meat Sci.* (2004) 66, 437.

<sup>177</sup> C. Vestergaard, J. Risum, J. Adler-Nissen. Quantification of salt concentrations in cured pork by computed tomography. *Meat Sci.* (2004) 68, 107.

niveles de cloruros, nitratos y nitritos en la carne picada, usando la voltametría de pulsos como herramienta analítica. La voltametría de pulsos representa una técnica ampliamente utilizada en las determinaciones analíticas, debido a su alta sensibilidad.

## **4.2. Experimental.**

### **4.2.1. Preparación de las muestras.**

En este trabajo, se han estudiado dos tipos de matrices: soluciones de sal (salmueras) y carne picada. La adición de las sales en cada tipo de muestras se realizó siguiendo un diseño experimental en el que se estableció un sistema de tres compuestos/tres niveles. El experimento diseñado considera los posibles efectos de las interacciones entre aniones, y proporciona un número total de 18 muestras. La distribución de los niveles de las distintas sales en cada muestra, se establecieron siguiendo un diseño experimental, mediante el uso del software MODE 8.0. Los niveles utilizados fueron: bajo (0), medio (125 mg /kg de nitritos y nitratos; 1.5% en peso de cloruro), y alto (250 mg/kg de nitritos y nitratos, el 3% en peso de cloruro).

Tabla 4.1. Composición de las muestras patrones de carne picada según MODDE 8.0

Muestra	NaNO <sub>2</sub> (ppm)	NaNO <sub>3</sub> (ppm)	NaCl (% en peso)
1	250	250	0
2	0	250	3
3	125	125	1.5
4	250	0	1.5
5	0	250	0
6	250	125	3
7	250	250	3
8	250	250	3
9	250	250	3
10	0	0	0
11	0	0	3
12	250	0	3
13	250	250	3
14	0	0	1.5
15	125	0	3
16	125	0	0
17	250	0	0
18	250	0	3

La carne de lomo de cerdo fue comprada en un mercado local y fue la utilizada como matriz más compleja. En este estudio la cantidad total de carne (100 g), fue dividida y picada antes de la adición de las sales. La adición y mezcla de cada una de las sales que se utilizaron (cloruro de sodio, nitrito de sodio y nitrato de

sodio) se llevó a cabo bajo condiciones controladas a fin de lograr la concentración exacta previamente definida en el diseño experimental.

Las sales se mezclan en forma sólida, con la carne picada. Las muestras fueron pesadas, etiquetadas y colocadas en un recipiente de plástico. Se mantuvieron bajo refrigeración a 4 °C durante cuatro días antes de ser analizadas a fin de garantizar la homogeneización adecuada. Las medidas de las muestras de carne picada con la lengua electrónica se llevaron a cabo directamente en estado semi-sólido.

#### **4.2.2. Principio y procedimiento de medida**

El dispositivo de lengua electrónica se compone de una serie de ocho electrodos de trabajo formado por varillas de distinto metales: Au, Pt, Ir, Rh, Cu, Co, Ni y Ag<sup>178,179,180</sup>. En este caso los cilindros de acero inoxidable actuaron como contraelectrodo y como pseudo-referencia. Los pulsos de potencial se han sido generados por el primer prototipo diseñado en el IDM (ver capítulo 1)<sup>181</sup>.

Las medidas se llevaron a cabo mediante la aplicación de un total de 32 pulsos de potencial fijo sobre los electrodos de trabajo, con un rango que varía entre + 0.5 y -0.5 V frente al contraelectrodo y con una duración de 40 ms. Cada

---

<sup>178</sup> R. H. Labrador, J. Olsson, F. Winqvist, R. Martínez-Máñez, J. Soto. Determination of bisulfites in wines with an electronic tongue based on pulse voltammetry. *Electroanal.* (2009) 21, 612.

<sup>179</sup> S. Holmin, P. Spangeus, C. Krantz-Rulcker, F. Winqvist. Compression of electronic tongue data based on voltammetry — a comparative study. *Sens. Actuators B: Chem* (2001) 76, 455.

<sup>180</sup> A. Gútes, F. Céspedes, M. Valle, D. Louthander, C. Krantz-Rulcker, F. Winqvist. A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters. *Sens. Actuators B: Chem* (2006) 115, 390.

<sup>181</sup> R. Masot. Tesis Doctoral: Desarrollo de un sistema de medida basado en espectroscopia de impedancia para la determinación de parámetros fisicoquímicos en alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. (2010).

muestra se midió por quintuplicado. Después de cada medida, la superficie de los electrodos fue regenerada mediante un proceso de pulido mecánico, el cual ofrece una superficie limpia y sin rayas, que es de elevada importancia a la hora de realizar cualquier estudio con la lengua electrónica<sup>182</sup>.

#### 4.2.3. Tratamiento de datos.

Con el fin de analizar los datos obtenidos con la lengua electrónica voltamétrica, se han utilizado varias técnicas de análisis multivariado, concretamente PLS1. Los datos de corriente registrados en las medidas fueron almacenados en un fichero de texto, que posteriormente fue importado al Matlab para la creación de la matriz X. Esta matriz está formada por 2048 columnas (8 valores de corriente muestreados para cada pulso x 32 pulsos aplicados a cada electrodo x 8 electrodos). El número de filas de la matriz se corresponde con el número de muestras medidas. Como cada muestra se midió por quintuplicado la matriz de X inicial estaba formada por 90 filas. Con el fin de aumentar la relación señal/ruido, las 5 repeticiones de cada muestra fueron promediadas, obteniendo una matriz final de dimensiones 18 x 2048. La matriz Y, está contiene la información de la concentración, y por tanto sus dimensiones son 18 x 3, al igual que la Tabla 1. Creadas las matrices X e Y, los datos fueron analizados mediante validación cruzada aplicando el método de “leave-one-out”. De este estudio se extrajo la cantidad de variables latentes a utilizar en los modelos de predicción. Con esta información, se crearon los modelos de predicción mediante PLS1 y se evaluaron mediante ajuste lineal de los datos predichos. Los parámetros de ajuste  $p_1$ ,  $r^2$ , NR y RMSEC ofrecerán información relativa a la capacidad predictiva de los modelos

---

<sup>182</sup> J. Olsson, F. Winqvist, I. Lundstrom. A self-polishing electronic tongue. Sens. Actuators B: Chem (2006) 118, 461.

creados en términos de exactitud y precisión. Todo el tratamiento de los datos se realizó con Matlab (versión R2007b, MathWorks).

### **4.3. Estudios de voltametría cíclica.**

Previamente a los experimentos con la lengua electrónica, se realizó un estudio de voltametría con el fin de determinar el comportamiento electroquímico de los aniones nitrato, nitrito y cloruro, frente a los diferentes electrodos metálicos. Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de concentración  $0.005 \text{ mol dm}^{-3}$  de los distintos aniones, todas ellas tamponadas en HEPES a pH 7 con una concentración de  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Las medidas de voltametría cíclica se realizaron usando el equipo Autolab PGSTAT100. La ventana electroquímica, dentro de la cual se realizaron dichas medidas fue configurada de la siguiente manera: para los electrodos Pt, Rh, Ir y Au comprendía el rango de potenciales que iba desde  $-1.25$  a  $1.25 \text{ V}$ . Para los electrodos no nobles, Cu, Ag, Ni y Co, la ventana se acortó debido a los procesos de corrosión que sufren estos metales cuando se someten a potenciales de oxidación elevados. En este caso la ventana electroquímica usada estuvo comprendida en un rango de  $-1.25$  a  $0.5 \text{ V}$ . Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y con una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

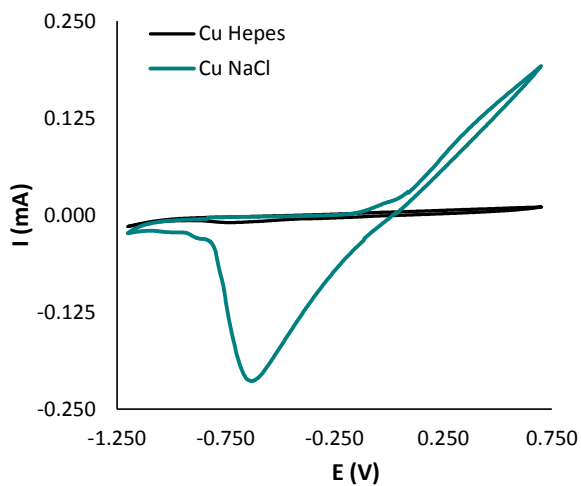


Figura 4.2. Voltagrama cíclico del disolvente, tampón HEPES  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 7 (línea negra) y  $0.005 \text{ mol dm}^{-3}$  de NaCl (línea verde), medido a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para el electrodo de cobre.

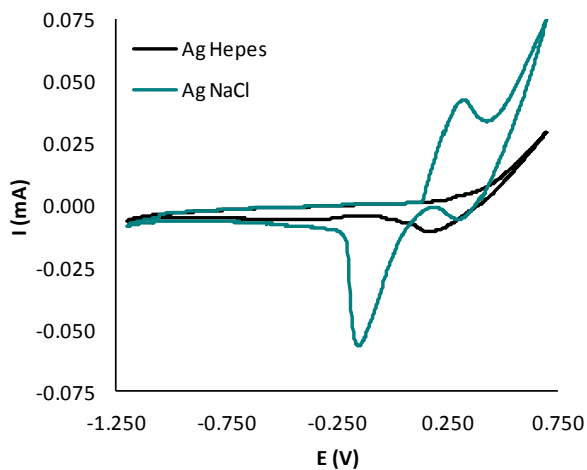


Figura 4.3. Voltagrama cíclico del disolvente, tampón HEPES  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 7 (línea negra) y  $0.005 \text{ mol dm}^{-3}$  de NaCl (línea verde), medido a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para el electrodo de plata.

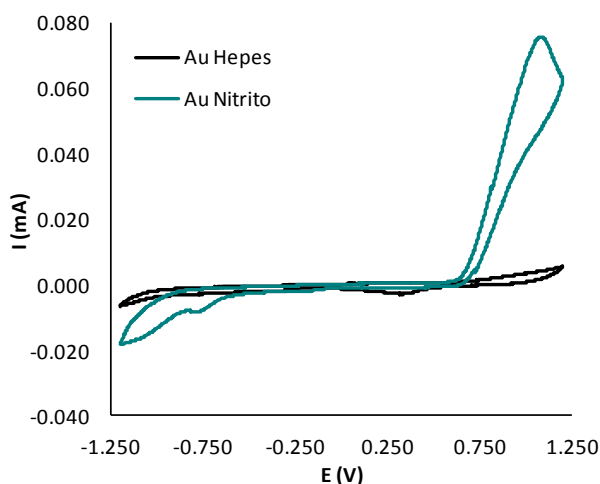


Figura 4.4. Voltagrama cíclico del disolvente, tampón HEPES  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 7 (línea negra) y  $0.005 \text{ mol dm}^{-3}$  de  $\text{NaNO}_2$  (línea verde), medido a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para el electrodo de oro.

Los estudios de voltametría cíclica llevados a cabo para el cloruro de sodio, no muestran ningún proceso redox importante cuando se utilizan metales nobles como el Pt, el Rh o el Ir, como electrodos de trabajo. La única excepción la encontramos para el electrodo de Au, para el cual se observó un aumento en la corriente de oxidación cuando se aplica un potencial de 0.9 V. Por el contrario, el cloruro muestra una importante respuesta electroquímica cuando se emplean electrodos de metales no nobles como, Cu, Co, Ni o incluso para la Ag. En las Figuras 4.2 y 4.3 se muestra la respuesta observada cuando se utilizan electrodos de plata y cobre para las muestras en agua de NaCl con una concentración de  $0.005 \text{ mol dm}^{-3}$  (línea verde) y una disolución de HEPES  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 7 (línea negra). El voltamograma del electrodo de cobre muestra una línea base prácticamente horizontal, sin embargo, cuando se produce la adición de cloruro se favorece la corrosión anódica del electrodo. Este aumento de corriente, probablemente sea debido a la formación de clorocomplejos de cobre. Cuando se



invierte el barrido, se observa un proceso catódico a un potencial de -0.6 V. La explicación más probable para este comportamiento, es que el proceso catódico esté asociado a la reducción de los clorocomplejos formados previamente sobre la superficie del cobre.

La Figura 4.3 muestra la respuesta del anión cloruro para el electrodo de Ag. En presencia de este anión, se observa un proceso de oxidación a 0.22 V. Este proceso es debido a la oxidación de la plata, que en presencia de cloruro forma un precipitado de  $\text{AgCl(s)}$ , sobre la superficie del metal. Cuando el barrido se invierte, aparece un pico a -0.125 V, que se atribuye a la reducción de la capa sólida de  $\text{AgCl (s)}$ .

Como se muestra en la Figura 4.4, al aplicar un potencial de 1 V vs SCE, el anión nitrito muestra un proceso de oxidación irreversible cuando se utilizan electrodos de metal noble. Este proceso es atribuido a la transformación de los nitritos en nitratos. Cuando se invierte el potencial se observa un proceso catódico en torno a -1.0 V, atribuido a la reducción del anión nitrato previamente generado en el proceso de oxidación del anión nitrito. Al realizar los estudios voltamétricos del nitrito se encontró, al igual que para el cloruro, que los electrodos no nobles, poseen un comportamiento redox diferente al del obtenido cuando se usan los electrodos de metal noble. Por ejemplo, el uso de cobalto en presencia de nitritos, da lugar a un significativo aumento en la intensidad de corrosión de este metal a un potencial de 0.25 V. Un comportamiento similar se observó para el electrodo de plata. En ambos casos, lo más probable es que la interacción entre el anión nitrito y el correspondiente catión generado en el proceso de oxidación del metal se vea favorecida, y proporcione así, el aumento en la intensidad de corriente mencionada anteriormente.

El ion nitrato muestra, cuando se utilizan electrodos de metales nobles, un proceso redox a -1.0 V vs SCE, que se atribuye a la reducción de nitrato a

nitrito<sup>183,184,185</sup>. Como en el caso de los nitritos, la presencia de nitratos induce en los electrodos no nobles, como el cobalto y el cobre, un aumento significativo en la intensidad de corrosión el metal.

En resumen, los estudios electroquímicos revelan la presencia de ambos efectos farádicos y no farádicos, que son característicos para cada especie, cuando se utiliza un conjunto de diferentes electrodos metálicos, nobles y no nobles. Estos estudios sugieren, que podría ser posible el uso de las diferencias en el comportamiento electroquímico que muestran cada electrodo para cada anión, para el diseño lenguas electrónicas capaces de detectar estos aniones en medios acuosos.

#### **4.4. Diseño del tren de pulsos aplicado.**

Teniendo en cuenta la respuesta voltamétrica obtenida para los aniones cloruro, nitrato y nitrito, en esta sección se va a detallar el proceso utilizado para transformar esta información electroquímica, en un conjunto adecuado de pulsos que se aplicará a la lengua electrónica. A pesar de que el primer uso de la lengua electrónica basado en voltametría de pulsos conteniendo electrodos metálicos nobles apareció en 1997, en la bibliografía se encuentran escasos ejemplos de lenguas electrónicas que utilizan electrodos de metales no nobles<sup>186,187</sup>. Además,

---

<sup>183</sup> K. Bouzek, M. Paidar, A. Sadílková, H. Bergmann. Electrochemical reduction of nitrate in weakly alkaline solutions. *J. Appl. Electrochem.* (2001) 31, 1185.

<sup>184</sup> S. Ureta-Zañartu, C. Yáñez. Electroreduction of nitrate ion on Pt, Ir and on 70:30 Pt:Ir alloy. *Electrochim. Acta* (1997) 42, 1725.

<sup>185</sup> J.F.E. Gootzen, P.G.J.M. Peeters, J.M.B. Dukers, L. Lefferts, W. Visscher, J.A.R. van Veen. The Electrocatalytic reduction of  $\text{NO}_3^-$  on Pt, Pd and Pt + Pd electrodes activated with Ge. *J. Electroanal. Chem.* (1997) 434, 171.

<sup>186</sup> L. Lvova, E. Martinelli, E. Mazzone, A. Pede, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico. Electronic tongue based on an array of metallic potentiometric sensors. *Talanta* (2006) 70, 833.

resaltar que el número de estudios realizados sobre la influencia del tren de pulsos en la clasificación y la capacidad de predicción de lenguas electrónica es limitado<sup>188,189</sup>.

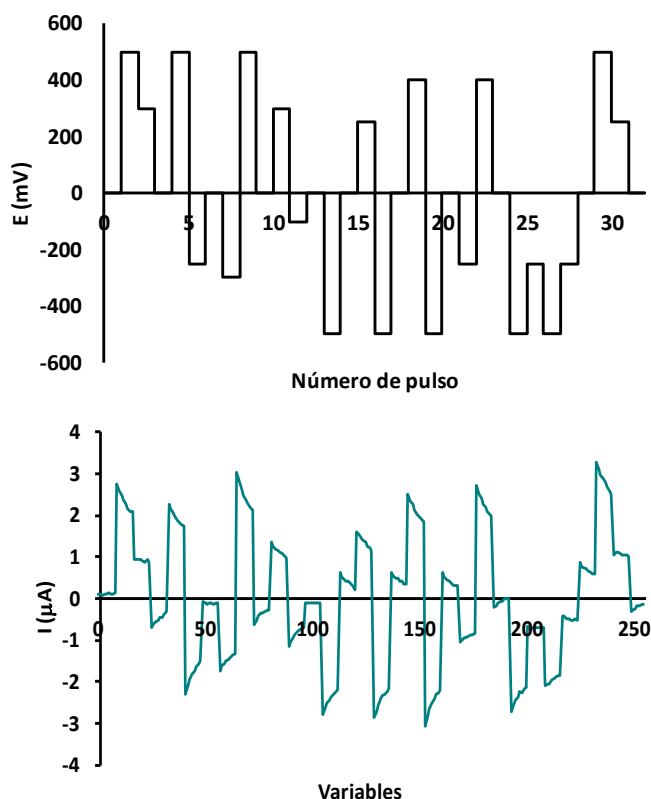


Figura 4.5. Potenciales aplicados (arriba), y corriente de respuesta (abajo) para el tren de pulsos “smart VAPV”.

<sup>187</sup> L. Gil, E. Garcia-Breijo, J. Ibañez, R.H. Labrador, E. Llobet, R. Martínez-Máñez, J. Soto. Electronic tongue for qualitative analysis of aqueous solutions of salts using thick-film technology and metal electrodes. *Sensors* (2006) 6, 1128.

<sup>188</sup> P. Ivarsson, S. Holmin, N. Höjer, C. Krantz-Rülcker, F. Winqvist. Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sens. Actuators B: Chem* (2001) 76, 449.

<sup>189</sup> S. Tian, S. Deng, Z. Chen. Multifrequency large amplitude pulse voltammetry: a novel electrochemical method for electronic tongue. *Sens. Actuators B: Chem.* (2007) 123, 1049.

La Figura 4.5 muestra el tren de pulsos diseñado teniendo en cuenta la información obtenida de los procesos de oxidación o reducción que se observó en los estudios de voltametría cíclica. Por lo tanto, para un electrodo determinado, primero se selecciona un pulso similar al potencial redox del pico, y de inmediato se aplica un pulso al potencial correspondiente del proceso electroquímico inverso. Por ejemplo, el electrodo de plata muestra, en presencia de aniones cloruro, un pico de oxidación irreversible a 0.5 V y un pico de reducción a -0.25 V frente al SCE. En el diseño del tren de pulsos "Smart VAPV", los pulsos que van del 4 al 6, se utilizan para detectar cloruros con el electrodo de plata. El pulso 4 se establece en 0 V, el pulso 5 se ajusta a 0.5 V, y el pulso 6 (contra-pulso) se ajusta a -0.25 V. El posterior uso de este pulso es importante porque si se generan especies de oxidación, estas se reducirán después de la aplicación de su correspondiente contra-pulso, lo que permitiera verificar la presencia de las especies con actividad redox. Otro ejemplo, lo podemos encontrar en el electrodo de cobre. Este electrodo muestra para el anión cloruro un pico de oxidación a 0.4 V y un pico de reducción a -0.6 V. Esta información fue utilizada para dar forma a los pulsos 18, 19 y 20 de la secuencia de pulsos "smart VAPV". La secuencia de pulsos de este pulso se estableció para los potenciales de 0, 0.4 y -0.5 V, respectivamente. Siguiendo este enfoque un total de 72 pulsos sería necesario (3 especies x 3 pulsos x 8 electrodos), sin embargo, algunos pulsos no proporcionaron información importante y finalmente, los 72 pulsos se redujeron a 32.

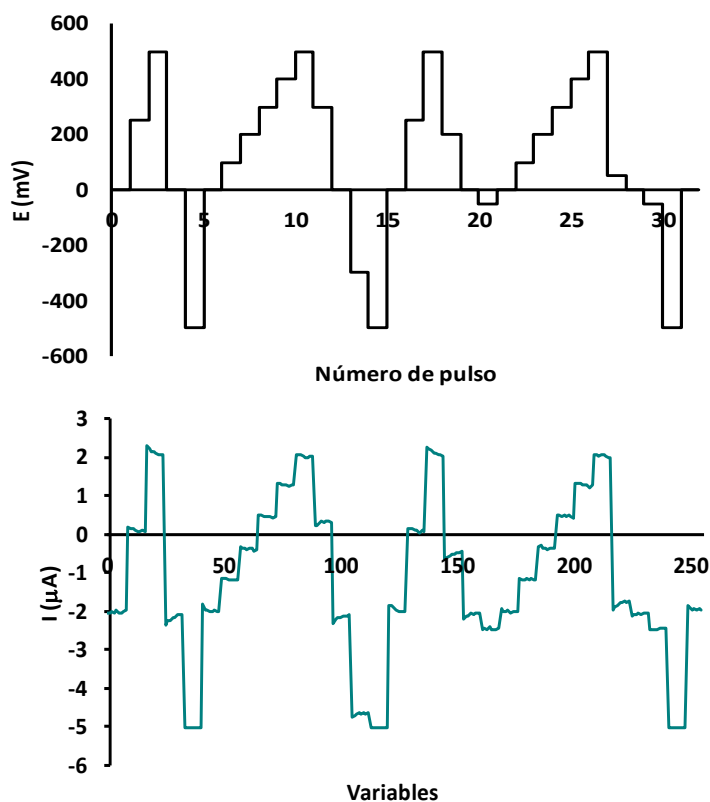


Figura 4.6. Potenciales aplicados (arriba), corrientes de respuesta (abajo) para el conjunto “random VAPV”.

Sobre la base de estos principios se utilizaron se desarrollaron dos trenes de pulsos diferentes:

1. “smart VAPV” que fue diseñado usando la secuencia de pulso/contrapulso que se ha explicado anteriormente.
2. “random VAPV” en el que los picos de oxidación y reducción se distribuyen al azar, sin utilizar el concepto de pulso/contrapulso.

Una descripción gráfica de estos dos conjuntos de pulsos se muestra en las Figuras 3.5 y 3.6, que muestran los potenciales aplicados (arriba) y las respuestas

obtenidas (abajo) cuando se aplican los pulsos “random VAPV”, y “smart VAPV”. Las señales de respuesta obtenidas corresponden a una muestra cuya composición era 250 mg/kg de nitritos y nitratos y 3% en peso de cloruro en muestras acuosas. En todos los estudios realizados, después de cada serie de pulsos, los electrodos se pulieron con alúmina con el fin de obtener superficies regulares y para eliminar los posibles productos que se acumulan en la superficie de los electrodos.

## **4.5. Resultados.**

### **4.5.1. Predicción de la concentración en las salmueras.**

Antes de los estudios en la carne picada, se ha llevado a cabo un estudio PLS1, para crear modelos de predicción para los aniones nitrito, nitrato y cloruro en las salmueras. Los modelos de predicción se realizaron con los dos trenes de pulsos anteriormente descritos, que se muestran en las Figuras 4.5 y 4.6. Mediante la aplicación de un diseño experimental adecuado, se establecieron el número mínimo de muestras representativas de todo el sistema. Este diseño experimental proporciona un total de dieciocho muestras que contienen diferentes niveles de concentración de sales en cada una de ellas. Los niveles utilizados fueron bajo (0), medio (125 mg/kg de nitritos y nitratos; 1.5% en peso de cloruro), y alto (250 mg/kg de nitritos y nitratos, el 3% en peso de cloruro).

Dado que los dispositivos de lengua electrónica son arrays de sensores individuales, puede ser interesante analizar el papel de los grupos de electrodos en función de su contribución a la respuesta total. Por ello, atendiendo a la reactividad de los metales, se crearon tres tipos de modelos de predicción:

1. Modelos de predicción a partir de las respuestas obtenidas por los electrodos de metales no nobles (Ni, Co y Cu, e incluyendo también los metales nobles que muestran cierta reactividad, como la Ag).
2. Modelos de predicción a partir de las respuestas obtenidas por los electrodos de los metales nobles (Au, Pt, Rh, Ir).
3. Modelos de predicción a partir de las respuestas de los 8 electrodos.

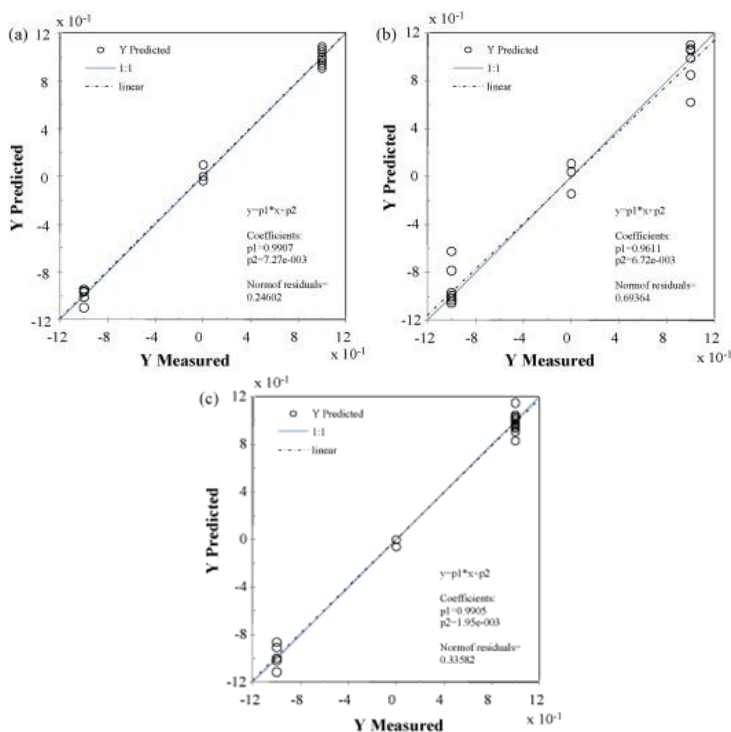


Figura 4.7. a) Gráfica de PLS1 de la predicción de nitrito en salmuera, usando el pulso "smart VAPV"; b) gráfica de PLS1 de la predicción nitrato en salmuera, usando el pulso "random VAPV"; c) gráfica de PLS1 de la predicción de cloruro en salmuera, usando el pulso "smart VAPV".

La Figura 4.7 muestra el gráfico de PLS1 para el cloruro y el nitrito cuando se utiliza el set de pulso "smart VAPV" y para el nitrato cuando se utiliza el set de

pulsos "random VAPV". A partir de una inspección simple a los gráficos se puede determinar que el sistema posee una exactitud y precisión elevadas ya que los puntos experimentales aparecen a lo largo de la línea de referencia 1:1. Además la línea que muestra la correlación entre los puntos experimentales (punteada) y la línea de referencia (azul) aparecen muy próximas. Sin embargo, un análisis más riguroso se logra mediante un ajuste lineal de los puntos experimentales. Dicho análisis se realizó usando un modelo lineal simple, es decir  $y = p_1x + p_2$ , obteniéndose dos parámetros  $p_1$  y  $p_2$  que se corresponden con la pendiente de la recta de ajuste y su ordenada en el origen, relacionados con la exactitud en la predicción que ofrece el modelo. Además de estos dos parámetros, los modelos de PLS1, proporcionan un tercer parámetro conocido como "norm of residuals", NR, que hace referencia a la precisión del modelo PLS1. El modelo es mucho mejor cuanto más próximo sea el valor de  $p_1$  a 1, y cuanto más cercanos estén los valores NR y RMSEC a 0.

Tabla 4.2. Parámetros de ajuste ( $p_1$ , NR,  $r^2$  y RMSEC) de los modelos de predicción de  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$  and  $\text{NaCl}$ , en salmueras, creados con la combinación de cada grupo de electrodos para el pulso "random VAPV".

		$p_1$	NR	$r^2$	RMSEC
$\text{NaNO}_2$	Todos	0.908	0.781	0.905	33.56
	Nobles	0.938	0.636	0.823	45.76
	No nobles	0.932	0.649	0.727	56.76
$\text{NaNO}_3$	Todos	0.923	0.971	0.889	37.87
	Nobles	0.961	0.694	0.883	39.03
	No nobles	0.954	0.745	0.897	36.66
$\text{NaCl}$	Todos	0.972	0.175	0.804	0.61
	Nobles	0.970	0.178	0.903	0.43
	No nobles	0.975	0.170	0.761	0.67



Tabla 4.3. Parámetros de ajuste ( $p1$ , NR,  $r^2$  Y RMSEC) de los modelos de predicción de  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$  and  $\text{NaCl}$ , en salmueras, creados con la combinación de cada grupo de electrodos para el pulso “smart VAPV”.

		p1	NR	r2	RMSEC
$\text{NaNO}_2$	Todos	0.991	0.246	0.955	23.15
	Nobles	0.958	0.555	0.935	27.80
	No nobles	0.977	0.397	0.963	20.80
$\text{NaNO}_3$	Todos	0.725	1.655	0.843	45.12
	Nobles	0.892	1.203	0.738	58.33
	No nobles	0.756	1.610	0.801	50.84
$\text{NaCl}$	Todos	0.978	0.153	0.968	0.25
	Nobles	0.992	0.102	0.965	0.26
	No nobles	0.988	0.114	0.967	0.25

Si se comparan las Tablas 4.2 y 4.3, se puede observar que tanto para el cloruro como para el nitrito, se obtienen mejores modelos cuando se usa el set de pulsos “smart VAPV”. Para los aniones cloruros se obtuvieron valores de  $p1 = 0.9920$  y  $NR = 0.10201$  cuando se utilizaron todos los electrodos. Para los iones nitratos se obtuvieron valores de  $p1 = 0.9907$  y  $NR = 0.24602$ , cuando se utilizaron solamente el conjunto de electrodos nobles. Esta buena predicción de la concentración de  $\text{NO}_2^-$  y de  $\text{Cl}^-$  se puede ver en la Figura 4.7. Dicha figura nos permite considerar el ajuste exacto y preciso, ya que la deriva encontrada para los valores predichos es insignificante. En el caso del nitrato el mejor modelo de predicción se observa cuando se utiliza “random VAPV”, que muestra unas capacidades de predicción similar a las encontradas para el nitrito y cloruro. Los parámetros de ajuste  $p1$  y NR son 0.9611 y 0.69364, respectivamente, lo que

confirma la capacidad de la lengua electrónica para calcular la concentración de este anión.

#### **4.5.2. Predicción de la concentración de sales en muestras de carne picada.**

Una vez comprobados los buenos resultados obtenidos para las muestras en salmuera, y siguiendo el mismo procedimiento experimental aplicado a estas, se llevó a cabo un estudio en una matriz mucho más compleja, como es el caso de la carne picada. A pesar de la heterogeneidad y la naturaleza semi-sólida de las muestras, las respuestas de intensidad frente a potencial recogidas en los electrodos de trabajo, mostraron una estabilidad y una relación señal/ruido baja, lo que indica, que para las condiciones de trabajo, se logró un buen contacto entre la muestra y la lengua electrónica. Para este estudio, se utilizaron los dos tipos de conjunto de pulsos; “random VAPV”, y “smart VAPV”. Al igual que en el caso de las salmueras, los datos experimentales obtenidos fueron analizados de manera conjunta para todos los electrodos, y por grupos de electrodos, nobles y no nobles.

Tabla 4.4. Parámetros de ajuste ( $p1$ , NR,  $r^2$  y RMSEC) de los modelos de predicción de  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$  and  $\text{NaCl}$ , en muestras de carne, creados con la combinación de cada grupo de electrodos para el pulso "ramdom VAPV".

		$p1$	NR	$r^2$	RMSEC
$\text{NaNO}_2$	Todos	0.945	0.896	0.856	29.65
	Nobles	0.793	1.557	0.717	49.21
	No nobles	0.708	1.750	0.496	63.98
$\text{NaNO}_3$	Todos	0.866	1.123	0.875	41.87
	Nobles	0.776	1.478	0.724	43.25
	No nobles	0.811	1.381	0.644	50.37
$\text{NaCl}$	Todos	0.954	0.643	0.856	0.75
	Nobles	0.776	1.398	0.772	0.51
	No nobles	0.889	1.067	0.833	0.78

Tabla 4.5. Parámetros de ajuste ( $p1$ , NR,  $r^2$  y RMSEC) de los modelos de predicción de  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$  and  $\text{NaCl}$ , en muestras de carne, creados con la combinación de cada grupo de electrodos para el pulso "smart VAPV".

		$p1$	NR	$r^2$	RMSEC
$\text{NaNO}_2$	Todos	0.960	0.763	0.864	27.54
	Nobles	0.969	0.664	0.863	32.54
	No nobles	0.904	1.145	0.789	29.51
$\text{NaNO}_3$	Todos	0.960	0.696	0.904	59.21
	Nobles	0.962	0.681	0.838	55.14
	No nobles	0.965	0.632	0.914	55.87
$\text{NaCl}$	Todos	0.991	0.336	0.937	0.28
	Nobles	0.971	0.549	0.902	0.30
	No nobles	0.978	0.514	0.928	0.29

Las Tablas 4.4 y 4.5 muestran que los resultados obtenidos en la predicción de sales en las muestras de carne presentan similitudes con el comportamiento predictivo encontrado en las salmueras. Sin embargo, al comparar los resultados de las Tablas 4.2 y 4.3, con los obtenidos en las Tablas 4.4 y 4.5, se puede comprobar una reducción en la capacidad de predicción, para las muestras de carne, debido al efecto matriz que aparece en estas últimas. Comparando las Tablas 4.4 y 4.5, también se puede observar que el tren de pulsos “smart VAPV” muestra mejores parámetros de ajuste que la secuencia “random VAPV “. Cabe destacar que los valores de ajustes obtenidos para los tres iones, cuando se utilizan los datos experimentales procedentes del conjunto de los 8 electrodos son muy buenos. Estos valores son, para p1 0.99053, 0.96031 y 0.95993, y para NR 0.33582, 0.69578 y 0.76295.

La mayor exactitud y precisión que proporciona el set de pulsos “smart VAPV” frente al “random VAPV” demuestra la importancia del diseño de la secuencia de pulsos a partir de los datos redox de voltametría cíclica y el uso del protocolo de pulso/contra-pulso. También cabe destacar que la diferencia en la respuesta entre los “smart VAPV” y el “random VAPV” es más evidente cuando se utilizan muestras de carne que cuando se utilizan muestras acuosas, lo que sugiere que cuando se utilizan matrices complejas como en el caso de la carne, pueden aparecer una amplia gama de compuestos con actividad redox, que deben de ser tenidos en cuenta, y que producen efectos negativos en la exactitud y la precisión de los modelos obtenidos.

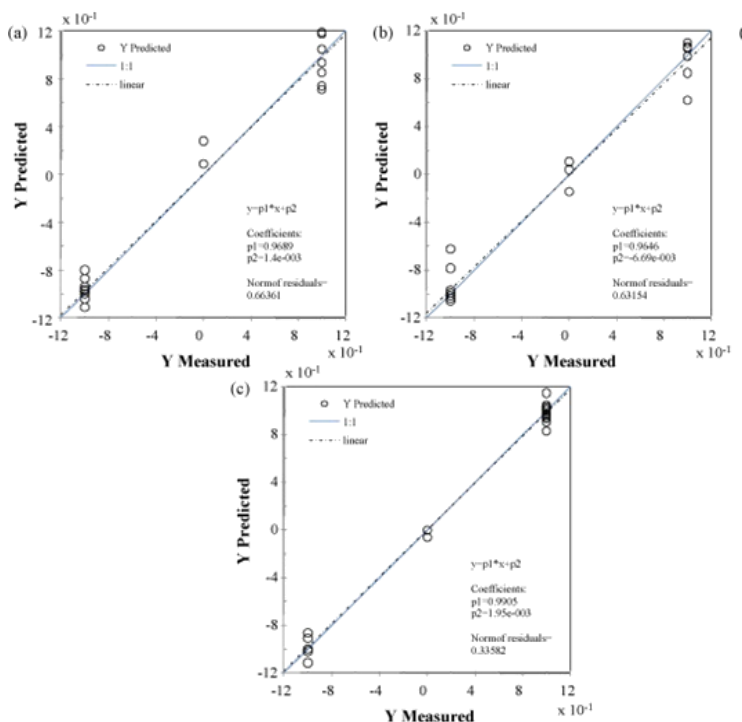


Figura 4.8. a) Gráfica de PLS1 de la predicción de nitrito; b) gráfica de PLS1 de la predicción de nitrato; c) gráfica de PLS1 de la predicción de cloruro; en muestras de carne, usando el pulso “smart VAPV”.

La buena predicción de la concentración de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{Cl}^-$ , se muestra en la Figura 4.8, que muestra buen ajuste exacto y preciso y una baja deriva de los valores previstos, especialmente para el cloruro y el nitrito. Estos resultados demuestran la capacidad de la lengua electrónica para determinar el contenido de sal en las muestras de carne.



## 4.6. Conclusiones.

Se ha desarrollado un método para predecir los niveles de nitrito, nitrato y cloruro en la carne picada basado en una lengua electrónica voltamétrica. La lengua electrónica consiste en un array de electrodos, divididos en 2 grupos: nobles (Au, Pt, Rh y Ir) y no nobles (Ni, Co, Cu y Ag) encapsulados en un cilindro de acero inoxidable utilizado al mismo tiempo, como cuerpo de la lengua electrónica y como contra-electrodo y electrodo de referencia.

Se ha demostrado que la capacidad de predicción de los niveles de cloruro, nitrato y nitritos en la salmuera es muy buena, mientras que en la carne picada, se produce una reducción en la predicción causada por un efecto de la matriz. Sin embargo, el modelo sigue mostrando una buena exactitud y precisión.

Los datos también muestran que el tren de pulsos "smart VAPV" proporciona ajustes mejores que la secuencia de pulsos "random VAPV", señalando la importancia del diseño del tren de pulsos en los experimentos de voltametría.

Los estudios llevados a cabo en este trabajo sugieren que la detección de cloruro, nitrato y nitrito en muestras reales se pueden realizar a través de la respuesta electroquímica de un sencillo, pero adecuado, array de electrodos metálicos.





## 4.7. Conclusions.

A method to predict the levels of nitrite, nitrate and chloride in minced meat based on a voltammetric electronic tongue has been developed herein. The electronic tongue consists of an array of electrodes, divided in 2 groups: noble (Au, Pt, Rh and Ir) and non-noble (Ni, Co, Cu and Ag) encapsulated in a stainless steel cylinder used at the same time as body of the electronic tongue, counter-electrode and electrode of reference.

It has been demonstrated that the prediction capacity of the levels of chloride, nitrate and nitrites in brines is very good, whereas in minced meat, a reduction in the prediction caused by a matrix effect takes place; nevertheless, the model continues showing good exactitude and precision.

The experimental data also show that the “smart VAPV” pulse array provides better fitting parameters than the “random VAPV” pulse array, indicating the importance of the design of the pulse array in the experiments of pulse voltammetry.

The studies performed in this work suggest that the detection of chloride, nitrate and nitrite in real samples can be made through the electrochemical response of a simple, but a suitable one, array of metallic electrodes.



## **Capítulo 5:**

# **Lengua electrónica para el control de la calidad en el proceso de depuración de las aguas residuales**



## 5.1. Introducción.

El agua es uno de recursos más necesarios para el desarrollo de la vida, por lo que es de vital importancia el control de su calidad tanto en el suministro a las personas como en la conservación de los recursos hídricos existentes.

El notable aumento en el consumo de este bien, tiene como consecuencia que el volumen de vertidos a los cauces de los ríos sea tan elevado que éstos han perdido su capacidad de autodepuración. A esta situación ha contribuido el creciente desarrollo industrial, las actividades agrícolas con el uso de grandes cantidades de plaguicidas y herbicidas, así como la concentración de población en grandes núcleos urbanos.

Son varios los problemas de contaminación que afectan a las aguas, entre ellos los relacionados con materia orgánica y los provocados por el exceso de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, como la eutrofización y la contaminación de las aguas subterráneas. Debido a esto, se hace necesario reducir la cantidad de los vertidos que se realizan así como la carga contaminante de los mismos. Una manera de llevar a cabo este objetivo es depurar estas aguas previamente a su vertido.

Por todo lo comentado anteriormente, existe una creciente preocupación en la sociedad sobre la protección del medio ambiente que ha llevado al establecimiento de estrictos requisitos en la gestión de las Estaciones de Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) con el objetivo de reducir el impacto en los ecosistemas acuáticos sobre los que se vierten. Estos nuevos requisitos han ejercido presión en los métodos de control del agua y en los procesos de tratamiento de aguas residuales. El uso de sensores para la vigilancia y control de los procesos biológicos que tienen lugar en la EDAR permitirá aumentar su capacidad de eliminación de contaminantes y lograr un funcionamiento coherente

y estable, que cumpla con los requisitos exigidos para los efluentes a un coste mínimo<sup>190</sup>. Tradicionalmente, la calidad de las aguas residuales tratadas se define mediante parámetros tales como la demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), la cantidad de aniones y cationes como amonio, ortofosfato, nitrato, sulfato, etc. Estos parámetros proporcionan información crítica sobre la calidad de las aguas residuales, tanto afluentes como efluentes, que es útil para el control del proceso y demostrar que el efluente cumple con los requisitos de descarga. Todos estos parámetros se determinan a través de técnicas tradicionales de análisis en laboratorio, que están fuera de línea y algunos de ellos, tal como la DBO requiere de 5 a 20 días para obtener el resultado, lo que hace que estas técnicas sean inadecuadas para la vigilancia y el control automatizado.

En las dos últimas décadas, los avances en el monitoreo on-line han sido cada vez más rápidos e innovadores<sup>191</sup>. Sin embargo, no todos los parámetros pueden ser medidos en línea y algunas investigaciones recientes<sup>192,193</sup> han señalado que el mantenimiento y funcionamiento de algunos de los analizadores es un tanto tedioso y consumen mucho tiempo en su manejo. Además la mayoría de ellos requiere considerables recursos económicos. De hecho, la inversión y los costes operativos de alguna manera pueden limitar la aplicabilidad de estos analizadores, especialmente en las EDAR de tamaño pequeño y mediano.

---

<sup>190</sup> G. Olsson, M.K. Nielsen, A. Yuan, A. Lynggaard-Jensen, J.P. Steyer. Instrumentation, Control and Automation in Wastewater Systems: Scientific and Technical Report Nº 15, IWA Publishing, (2005) London.

<sup>191</sup> C.K. Yoom, P.A. Vanrolleghem, I.B. Lee. Nonlinear modeling and adaptive monitoring with fuzzy and multivariate statistical methods in biological wastewater treatment plants. *J. Biotechnol.* (2003) 105, 135.

<sup>192</sup> M.V. Ruano, J. Ribes, A. Seco, J. Ferrer. Low cost-sensors as a real alternative to on-line nitrogen analysers in continuous systems. *Water Sci. Technol.* (2009) 60, 3261.

<sup>193</sup> G. Olsson. Control of wastewater treatment systems. *ISA Transactions* (1992) 31, 87-96.

Muy pocos estudios se han realizado con respecto a la aplicación de lenguas electrónicas en la caracterización de aguas residuales. Por lo que sabemos sólo un ejemplo reciente se ha dedicado a la caracterización de las aguas procedentes de la industria papelera<sup>194</sup>. Sin embargo, creemos que las lenguas electrónicas pueden tener una amplia gama de aplicaciones en el control de la calidad del agua en los efluentes de aguas residuales debido a su fácil uso, la sencilla aplicación en línea y su bajo coste.

A raíz de nuestro interés en el diseño del sistema de detección<sup>195,196,197,198,199</sup> hemos desarrollado una lengua electrónica voltamétrica simple que se ha utilizado para caracterizar el tratamiento de las aguas afluentes y efluentes para una planta depuradora de aguas residuales domésticas. El sistema propuesto consiste en una array de electrodos metálicos formado por Au, Pt, Ir, Rh, Ag, Cu, Ni y Co y su uso como electrodos de trabajo en los experimentos de voltametría. Con este sistema y el uso de herramientas estadísticas como la regresión de mínimos cuadrados parciales, se obtiene la información de los parámetros que

---

<sup>194</sup> A. Gutes, F. Cespedes, M. Del Valle, D. Louthander, C. Krantz-Rülcker, F. Winquist. A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters, *Sens. Actuators B: Chem* (2006) 115, 390.

<sup>195</sup> R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. García-Breijo, L. Gil, J. Ibáñez, E. Gadea. A multisensor in thick-film technology for water quality control. *Sens. Actuators A: Phys* (2005) 120, 589.

<sup>196</sup> R. Masot, M. Alcañiz, A. Fuentes, F.C. Schmidt, J.M. Barat, L. Gil, D. Baigts, R. Martínez-Máñez, J. Soto. Design of a low-cost non-destructive system for punctual measurements of salt levels in food products using impedance spectroscopy. *Sens. Actuators A: Phys* (2010) 158, 217.

<sup>197</sup> R.H. Labrador, J. Soto, R. Martínez-Máñez, C. Coll, A. Benito, J. Ibáñez, E. García-Breijo, L. Gil. An electrochemical characterization of thick-film electrodes based on RuO<sub>2</sub>-containing resistive pastes. *J. Electroanal. Chem.* (2007) 611, 175.

<sup>198</sup> M.E. Moragues, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón. Chromogenic and fluorogenic chemosensors and reagents for anions, a comprehensive review of year 2009. *Chem. Soc. Rev.* (2011) 40, 2593.

<sup>199</sup> R. Martínez-Máñez, F. Sancenón. Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. *Chem. Rev.* (2003) 103, 4419.

normalmente se encuentran como contaminantes en las aguas residuales, como la demanda química de oxígeno disuelto (DQO), demanda biológica de oxígeno disuelto (DBO), nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ), ortofosfato ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4\text{-S}$ ) con resultados satisfactorios.

## 5.2. Experimental.

### 5.2.1. Descripción de la planta piloto.

La planta piloto utilizada en este estudio es un biorreactor anaeróbico de membrana sumergida (SAMBR) para el tratamiento de las aguas residuales domésticas.



Figura 5.1. Biorreactor anaeróbico de membrana sumergida de la planta piloto.

La planta piloto SAMBR de la Figura 5.1, se compone de un reactor anaeróbico de  $1.3 \text{ m}^3$  ( $1 \text{ m}^3$  de volumen de trabajo) conectado a dos tanques de separación de  $0.8 \text{ m}^3$ , cada uno con un sistema comercial de ultrafiltración por membrana (Puron®, Koch Membrane Systems,  $0.05 \mu\text{m}$  de tamaño de poro). También se



incluyen como elementos principales de la planta un rotofiltro (0.5 mm tamaño de la pantalla), un tanque de ecualización ( $0.3 \text{ m}^3$ ) y un tanque de limpieza in-situ ( $0.2 \text{ m}^3$ ).

La planta es alimentada con el efluente de la EDAR de Carraixet que ha sufrido un pre-tratamiento que incluye los procesos de cribado, desarenado y eliminación de grasas. Una vez en el reactor anaeróbico, una parte del biogás producido se recicla para mejorar las condiciones de agitación y para favorecer la extracción de los gases producidos en el proceso. El lodo se recicla continuamente a lo largo de los tanques de membrana externa, donde el efluente se obtiene por filtración a vacío. Las condiciones experimentales del reactor fueron:

- tiempo de retención de lodos (SRT): 60 días
- tiempo de retención hidráulica (TRH): 12 horas
- temperatura de trabajo:  $20^\circ \text{C}$ .

### **5.2.2. Muestreo de las aguas residuales y métodos analíticos.**

Las muestras de aguas residuales se recogieron por medio de bombas automáticas situadas en los afluentes y efluentes. Estas muestras se mantuvieron en un refrigerador a  $4^\circ \text{C}$  durante el periodo de muestreo. Los parámetros analizados, tanto para las aguas de entrada como para las de salida, fueron los siguientes: DQO, DBO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , Acidez Volátil (HAC) y Alcalinidad. Todas las técnicas analíticas utilizadas en este trabajo se corresponden con los métodos analíticos estándar<sup>200</sup>. Algunas de las muestras fueron diluidas, obteniendo así, un mayor número de muestras y un rango de concentraciones

---

<sup>200</sup> A. Greenberg. Standard methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation (21th ed.) Washington DC (2005).

más amplio. La dilución de las mismas, proporciona mayor información para desarrollar los modelos de predicción mediante PLS.

### **5.2.3. Procedimiento de medida.**

Las aguas residuales procedentes de la EDAR se midieron con la lengua electrónica a temperatura ambiente,  $20 \pm 2$  °C. Las muestras se midieron utilizando el segundo prototipo desarrollado en el IDM y que ha sido descrito anteriormente (Capítulo 1). El pulso que se aplicó estaba formado por 10 pulsos: 200, 0, 600, -500, 0, 400, -700, 0, 750 y 150 mV, con una duración de pulso de 40 ms. Este set de pulsos fue diseñado a partir de la información voltametría cíclica. El número total de muestras preparadas fue 39, de las cuales 10 procedieron de la planta piloto y 29 se obtuvieron a partir de diluciones de las 10 muestras originales. Este proceso se realizó para las aguas procedentes tanto del afluente como del efluente. Para cada grupo de muestras, afluente y efluente, se utilizaron 28 muestras como conjunto de entrenamiento/calibrado del sistema, y 11 muestras para el conjunto de validación, todas ellas seleccionadas al azar. Cada muestra se midió en cinco ocasiones y en una etapa de procesamiento se realizó la media de ellas. El valor típico de la desviación estándar dentro de una muestra no suele superar el valor de 0.5  $\mu\text{A}$  para los electrodos de metales noble, mientras que para los electrodos de cobalto y níquel fue algo mayor. Cuando la desviación estándar fue superior a 0.5, la serie de datos se eliminó y se sustituyó por una nueva repetición.

#### **5.2.4. Tratamiento de datos.**

Los datos experimentales se sometieron a un análisis cuantitativo, que se llevó a cabo mediante el uso de una herramienta estadística conocida como mínimos cuadrados parciales (PLS).

Los datos de corriente registrados en las medidas son almacenados en un fichero de texto, que posteriormente fue importado al Matlab para la creación de la matriz X. Esta matriz está formada por 8000 columnas (100 puntos/pulso x 10 pulsos x 8 electrodos). El número de filas de la matriz se corresponde con el número de muestras medidas. Como cada muestra se midió por quintuplicado la matriz de X inicial para el set de calibración estaba formada por 140 filas y el de validación por 55. Con el fin de aumentar la relación señal/ruido, las 5 repeticiones de cada muestra fueron promediadas, obteniendo una matriz final de dimensiones 28 x 8000 para el set de calibración y de 11 x 8000 para el de validación. Las matrices de Y, contienen la información de la concentración. Creadas las matrices X e Y, los datos fueron analizados mediante validación cruzada aplicando el método de “leave-one-out”. De este estudio se extrajo la cantidad de variables latentes a utilizar en los modelos de predicción. De este estudio se extrajo la cantidad de variables latentes a utilizar en los modelos de predicción.

#### **5.3. Estudios de voltametría cíclica.**

Previamente a los experimentos con la lengua electrónica, se realizó un estudio de voltametría con el fin de determinar el comportamiento electroquímico de los iones sulfato, amonio y ortofosfato utilizando diferentes electrodos metálicos. Estos iones fueron elegidos porque son los habituales en los análisis que se realizan en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Los iones acetato y bicarbonato han sido estudiados mediante esta técnica porque se han usado para

simular el comportamiento de la HAC y de la Alcalinidad. Dichos estudios se llevaron a cabo utilizando disoluciones acuosas  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  de las sales de sulfato, ortofosfato, acetato y bicarbonato de amonio. Todas las disoluciones fueron tamponadas en HEPES con una concentración de  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 7.

Los experimentos de voltametría cíclica se realizaron con el equipo Autolab PGSTAT100, utilizando la lengua electrónica con los metales como electrodos de trabajo y el cilindro de acero inoxidable como contra-electrodo frente a un SCE como electrodo de referencia. La velocidad de barrido fue de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  y la temperatura de medida fue la temperatura ambiente ( $20 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Como es sabido, la respuesta electroquímica de un compuesto dado depende de la naturaleza química intrínseca de los electrodos redox y del comportamiento del compuesto en sí. Además, la respuesta transitoria de los electrodos depende de los coeficientes de difusión de la especie oxidada o reducida y de la posible presencia de reacciones químicas o electroquímicas específicas entre el electrodo y la especie redox-activa. La lengua electrónica se basa en el concepto de que sutiles diferencias entre compuestos relativamente similares podrían reflejarse en una respuesta voltamétrica específica del conjunto de electrodos.

La mayoría de los aniones estudiados por voltametría cíclica, no mostraron ningún proceso redox bien definido para una ventana electroquímica en el rango de -1.0 a 1.0 V cuando se estudiaron varios electrodos, en particular para los electrodos de metal noble. A pesar de este comportamiento, la falta de claridad en los procesos redox no tiene por qué impedir el uso de las lenguas electrónicas voltamétricas ya que varios efectos, como la presencia de efectos no-farádicos debidos a la adsorción química sobre el electrodo, o la influencia que la presencia de especies químicas puede tener en las corrientes de la reducción o la oxidación del agua o en el potencial de equilibrio del electrodo, puede ser útil para el análisis de datos multivariado. De hecho, a pesar de la ausencia de picos redox

bien definidos, en muchos casos la presencia de los iones se observa debido a los cambios que se producen en la línea base o en la corrosión del metal.

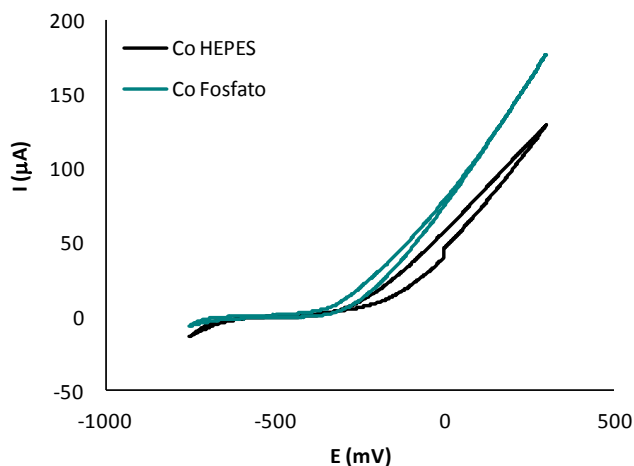


Figura 5.3. Voltagrama cíclico para el disolvente, tampón HEPES 0.01 mol dm<sup>-3</sup> a pH 7 (línea negra) y 0.001 mol dm<sup>-3</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (línea verde) medidos a 100 mV s<sup>-1</sup> para el electrodo de Cobalto.

Por ejemplo, el ión ortofosfato muestra un comportamiento electroquímico muy significativo y variado en función del electrodo estudiado. Como se observa en la Figura 5.3, cuando este anión está presente, se observan una serie de cambios en los procesos de corrosión anódica de los metales no nobles, por ejemplo, los electrodos de níquel o de cobalto muestran un aumento significativo en la intensidad de la corrosión.

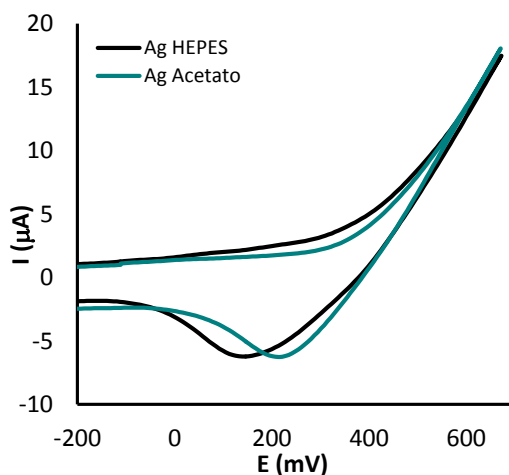


Figura 5.4. Voltagrama cíclico para el disolvente, tampón HEPES  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 7 (línea negra) y  $0.001 \text{ mol dm}^{-3}$  de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (línea verde) medidos a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para el electrodo de Plata.

Por el contrario, cuando se trabaja con un electrodo de plata, la presencia de iones acetato en la disolución provocó un cambio en el potencial de reducción del anión  $\text{Ag}^+$  previamente formado a potenciales más elevados (Figura 5.4).

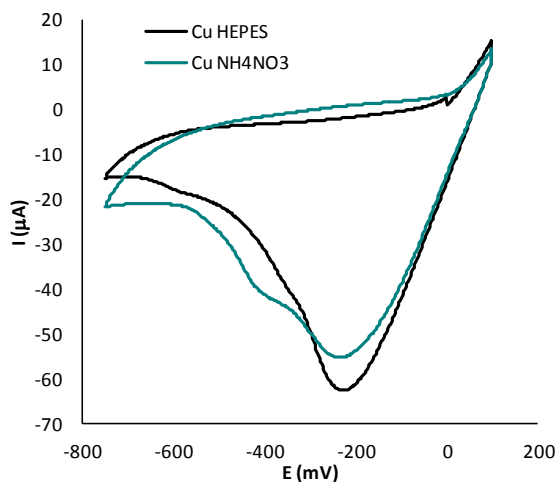


Figura 5.5. Voltagrama cíclico para el disolvente, tampón HEPES  $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 7 (línea negra) y  $0.001 \text{ mol dm}^{-3}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (línea verde) medidos a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para el electrodo de Cobre.

En el caso del Cu, el ión ortofosfato muestra dos picos de oxidación bien definidos aproximadamente a 30 y 420 mV vs SCE y cuando el barrido se invierte un pico de reducción a -300 mV vs SCE. Estos cambios en el proceso se pueden atribuir hipotéticamente a la formación de los complejos de fosfato-metal. Otro ejemplo interesante es el comportamiento que presenta el ion amonio. Este catión aumenta significativamente la velocidad de corrosión de los electrodos de cobre y cobalto. Es de destacar que en el caso particular del cobre, se encontró un pico adicional de reducción a -430 mV cuando el barrido de potencial se invirtió (Figura 5.5). El ion amonio tiene en el electrodo de platino de un proceso oxidativo relativamente importante a un potencial de 0.5 voltios. Además, cuando se alcanza un potencial de + 0.9 voltios se produce un notable incremento en la intensidad. Estas ondas de voltametría se atribuyen a la oxidación de amonio a nitrito y su posterior oxidación a nitrato. El ion acetato también muestra un comportamiento electroquímico importante. Por ejemplo, cuando se utilizó la Ag como electrodo de trabajo, se observó un pico de reducción irreversible a 210 mV vs SCE. Un proceso de reducción similar se encontró a -500 mV vs SCE para el electrodo de Cu en presencia de acetato. En presencia de iones acetato, los electrodos de Co y Ni sufrieron notables cambios en la corrosión anódica. Por otra parte, el sulfato y bicarbonato ofrecieron, en general, una respuesta electroquímica más pobre y en la mayoría de los casos sólo se observaron cambios mal definidos de la línea de base.

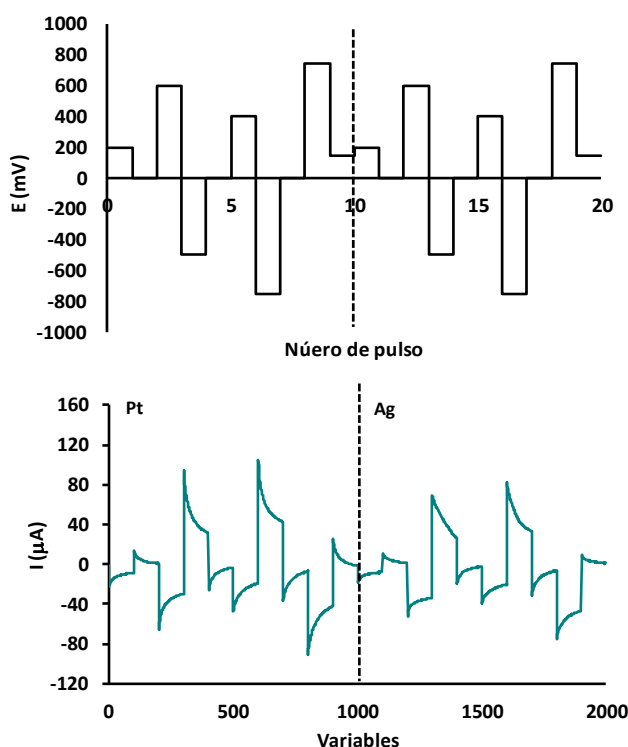


Figura 5.6. a) Secuencia de pulsos aplicada y (b) respuesta obtenida para los electrodos de Pt y Ag.

En la Figura 5.6-a se muestra la secuencia de pulsos aplicada a la lengua voltamétrica para la caracterización de las aguas residuales, que ha sido diseñada teniendo en cuenta la información electroquímica de las diferentes especies presentes en aguas residuales domésticas, mediante estudios de voltametría cíclica. El pulso 1 con un potencial de 200 mV, se corresponde con el pico de reducción del ión acetato cuando se utiliza el electrodo de Ag. El anión fosfato provoca un aumento de la corrosión del níquel que se traduce en una pico a 600 mV (pulso 3). A un potencial de -500 mV, el ión acetato proporciona un pico de reducción sobre el electrodo de cobre (pulso 4). El pulso 6 a 400 mV, está relacionado con la respuesta del anión fosfato con el electrodo de cobre. El



amonio muestra un pico con el cobre a -750 mV que se corresponde con el pulso número 7. Los pulsos 9 y 10, con un potencial de 750 y 150, respectivamente, se corresponden con la oxidación del amonio cuando se utiliza como electrodo de trabajo el oro. Por otra parte pulsos de 2, 5 y 8 con potenciales de 0 mV, proporcionan información acerca de los procesos no-farádicos.

Por otro lado, en la Figura 5-b la respuesta obtenida para una muestra cuando se aplica la secuencia de pulsos a los electrodos de Pt y Ag.

Aunque no se realizaron estudios electroquímicos con los contaminantes orgánicos (a excepción del acetato), con el array de electrodos empleados en la lengua electrónica, se espera que la presencia de materia orgánica también se traduzca en cambios en la respuesta electroquímica de esta, ya que es susceptible de ser oxidada y por tanto de generar una señal electroquímica. En este sentido, hay investigaciones<sup>201,202</sup> que han demostrado que la DQO se puede estimar mediante la electrólisis exhaustiva utilizando diferentes electrodos y han encontrado que la carga farádica neta, relacionada con el número de electrones que se consume en la electrólisis (oxidación) de las especies orgánicas, se puede correlacionar con la DQO.

---

<sup>201</sup> R. Roessler-Fromme, F. Scholz. A solid composite electrode for the determination of the electrochemical oxygen demand of aqueous samples. *J. Anal. Chem.* (1996) 356, 197.

<sup>202</sup> K.H. Lee, Y. Ishikawa, S.J. McNiven, Y. Nomura, A. Hiratsuka, S. Sasaki, Y. Arikawa, I. Karube. Evaluation of chemical oxygen demand (COD) based on coulometric determination of electrochemical oxygen demand (EOD) using a surface oxidized copper electrode. *Anal. Chim. Acta.* (1999) 398, 161.

## 5.4. Resultados.

### 5.4.1. Estudios que utilizan la lengua electrónica.

La segunda parte de este trabajo estuvo dedicado a la aplicación de la lengua electrónica para la caracterización de las aguas afluentes y efluentes de una planta depuradora el tratamiento de aguas residuales domésticas. Debido a su diferente composición química, las muestras han sido divididas en dos grupos, es decir, las muestras de agua afluente y las de agua efluente. La entrada de agua a la planta de tratamiento tiene un carácter típico de las aguas residuales urbanas con alto contenido de materia orgánica biodegradable (grasas en suspensión o emulsionadas, jabones, surfactantes, ortofosfatos, amoníaco, urea, proteínas, aminoácidos, azúcares, etc., y un componente de fondo iónico, que consiste en sales disueltas, como cloruros, bicarbonatos, sulfatos, etc.), mientras que el agua de salida tiene una naturaleza física muy diferente debido al tratamiento anaerobio utilizado en esta planta piloto específica (alto contenido de azufre, que está estrechamente relacionado con la química la demanda de oxígeno).

La lengua electrónica fue utilizada para caracterizar las muestras. Cabe señalar que los estudios desarrollados en este trabajo se han llevado a cabo durante varias semanas (aproximadamente una o dos muestras se tomaron de la planta de aguas residuales cada una o dos semanas). Por lo tanto, la lengua electrónica fue utilizada durante al menos cinco meses sin mantenimiento más allá de un pulido simple.

### 5.4.3. Análisis de PLS.

El análisis por regresión por mínimos cuadrados parciales PLS1 se utilizó para obtener una correlación entre las medidas de voltametría con la lengua electrónica y las concentraciones de DBO, DQO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , HAC y Alk, los cuales fueron obtenidos usando métodos de análisis convencionales. El número de variables latentes en PLS1 es un parámetro del procedimiento, cuyo valor se calcula a partir de los datos de calibración, mediante la validación cruzada. Para este estudio, el empleo del método de “leave-one-out” en la validación cruzada determinó que el número adecuado de variables latentes a utilizar fue de 5. A cada parámetro de interés se aplicó un procedimiento de entrenamiento y uno de validación. Aleatoriamente dos terceras partes de las muestras se seleccionaron para calibrar el sistema, con el fin de obtener los coeficientes de PLS1, y el tercio de los datos restantes se utilizó en una segunda etapa de validación. Para los pasos de calibración y validación se utilizaron un total de 28 y 11 muestras, respectivamente.

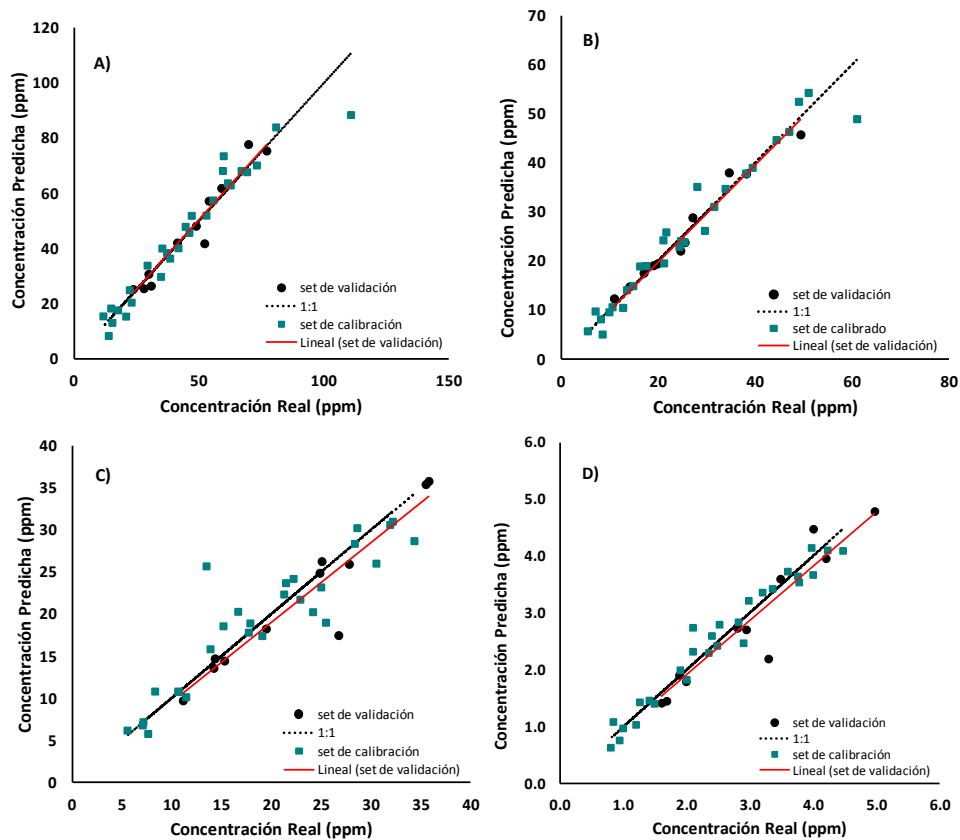


Figura 5.7. Resultados de la predicción de PLS1 en las 11 muestras de validación de afluentes de(A) DQO; (B) DBO (C) NH<sub>4</sub>-N, (D) PO<sub>4</sub>-P. La trama también muestra el modelo de 28 muestras del conjunto de entrenamiento.

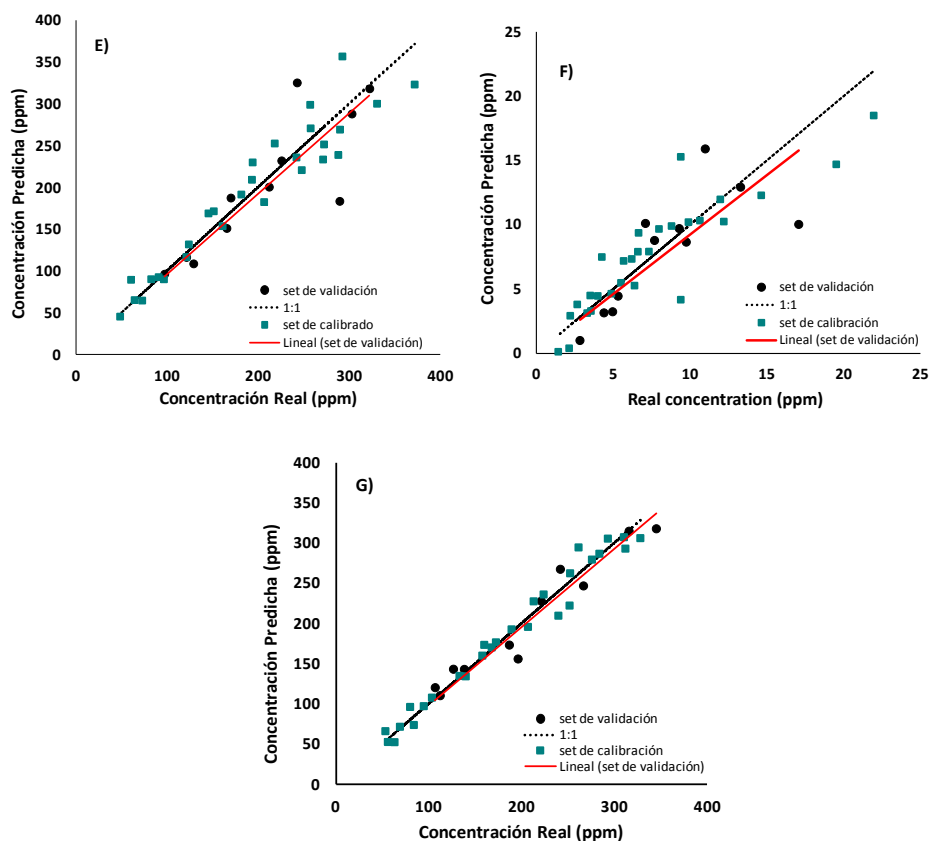


Figura 5.8. Resultados de la predicción de PLS1 en las 11 muestras de validación de afluentes de (E) SO<sub>4</sub>-S; (F) HAC; (G) Alk. La trama también muestra el modelo de 28 muestras del conjunto de entrenamiento.

Para evaluar la calidad del agua residual, se aplicó el método de calibración y validación por PLS1 a los datos tanto de entrada como de salida, para los parámetros DBO, DQO, NH<sub>4</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, SO<sub>4</sub>-S, HAC y Alcalinidad. En las Figuras 5.7 y 5.8 se muestran los resultados de los modelos de predicción de PLS1 para la validación del conjunto de los parámetros de calidad del agua en las muestras del afluente.

Tabla 5.1. Parámetros de ajuste ( $r^2$ ,  $p1$ ,  $p2$ , RMSEC, RMSECV y RMSEP) de los modelos de predicción PLS1 para los niveles de DQO, DBO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , HAC y Alk en las muestras de validación de las aguas del afluente.

	$r^2$	$p1$	$p2$	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Rango de concentración (ppm)
DQO	0.944	0.990	-2.99	1.8	7.94	4.51	15-120
DBO	0.975	0.950	1.59	2.83	4.69	1.86	5-70
$\text{NH}_4\text{-N}$	0.899	0.978	-0.72	1.18	5.81	2.94	5-40
$\text{PO}_4\text{-P}$	0.903	0.988	-0.24	0.11	0.34	0.40	0.5-5
$\text{SO}_4\text{-S}$	0.726	0.907	13.04	20.66	39.26	42.03	50-400
HAC	0.583	0.821	1.07	1.72	3.62	2.92	1-25
Alk	0.941	0.907	16.23	18.79	26.75	19.31	50-350

Tabla 5.2. Parámetros de ajuste ( $r^2$ ,  $p1$ ,  $p2$ , RMSEC, RMSECV y RMSEP) de los modelos de predicción PLS1 para los niveles de DQO, DBO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , HAC y Alk en las muestras de validación de las aguas del efluente.

	$r^2$	$p1$	$p2$	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Rango de concentraciones (ppm)
DQO	0.769	0.726	57.88	39.01	71.64	57.72	50-500
DBO	0.828	0.717	42.01	25.77	31.41	31.30	25-300
$\text{NH}_4\text{-N}$	0.899	0.786	7.91	4.87	5.93	5.17	10-70
$\text{PO}_4\text{-P}$	0.862	0.793	1.20	0.60	0.95	0.82	1-10
$\text{SO}_4\text{-S}$	0.764	0.519	5.17	4.13	6.25	10.37	2.5-50
HAC	0.537	0.562	32.93	35.85	39.72	47.93	0-250
Alk	0.567	0.454	179.69	82.50	165.44	153.22	100-700

Además las Tablas 5.1 y 5.2 muestran los parámetros de ajuste ( $r^2$ ,  $p_1$ ,  $p_2$ , RMSEC, RE, RMSECV y RMSEP) de los modelos de predicción PLS1 aplicados a los datos de validación para el conjunto de los parámetros de calidad del agua tanto en los afluentes y como en los efluentes. Como se puede observar en las Tablas 5.1 y 5.2 el rango de concentraciones de contaminantes del efluente es mayor que el rango de las concentraciones del afluente. Esto se debe al hecho de que las concentraciones presentadas corresponden a la fracción soluble de los contaminantes, que aumentan como resultado de la hidrólisis lenta de la materia orgánica biodegradable. Obviamente, la concentración total de cada parámetro en el afluente es mayor que la concentración medida en el efluente (la concentración total de contaminantes no se muestran en el documento).

Las Figuras 5.7 y 5.8 permiten, mediante un simple análisis visual, la evaluación de la exactitud y precisión de los modelos de predicción creados para el conjunto de las muestras de validación. Mediante un simple examen a la Tabla 5.1 y las Figuras 5.7 y 5.8, se evidencia que la lengua electrónica muestra un poder de predicción relativamente bueno para la determinación de DBO, DQO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , y Alk, mientras que la predicción del HAC fue significativamente peor. Por ejemplo, se observaron valores de  $r^2$  para el conjunto de validación mayores que 0.9 para los parámetros DQO, DBO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$  y Alk. Además, en todos estos casos se encontraron valores de  $p_1$  cercanos a uno, lo que indica un alto grado de exactitud en la predicción. Por ejemplo, a partir de los modelos de PLS1 y de los parámetros de ajuste, se puede demostrar estadísticamente que es posible determinar la concentración media de estos parámetros en el conjunto de validación usando la lengua electrónica con errores inferiores al 10%, lo cual es un resultado notable. De hecho, en la Figura 5.7 y 5.8 se puede observar que, a pesar de algunos datos muestran claramente errores grandes, la mayoría de los datos

en el conjunto de validación de estos parámetros (DQO, DBO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$  y ALK) se encuentran muy cerca de la línea de ajuste 1: 1.

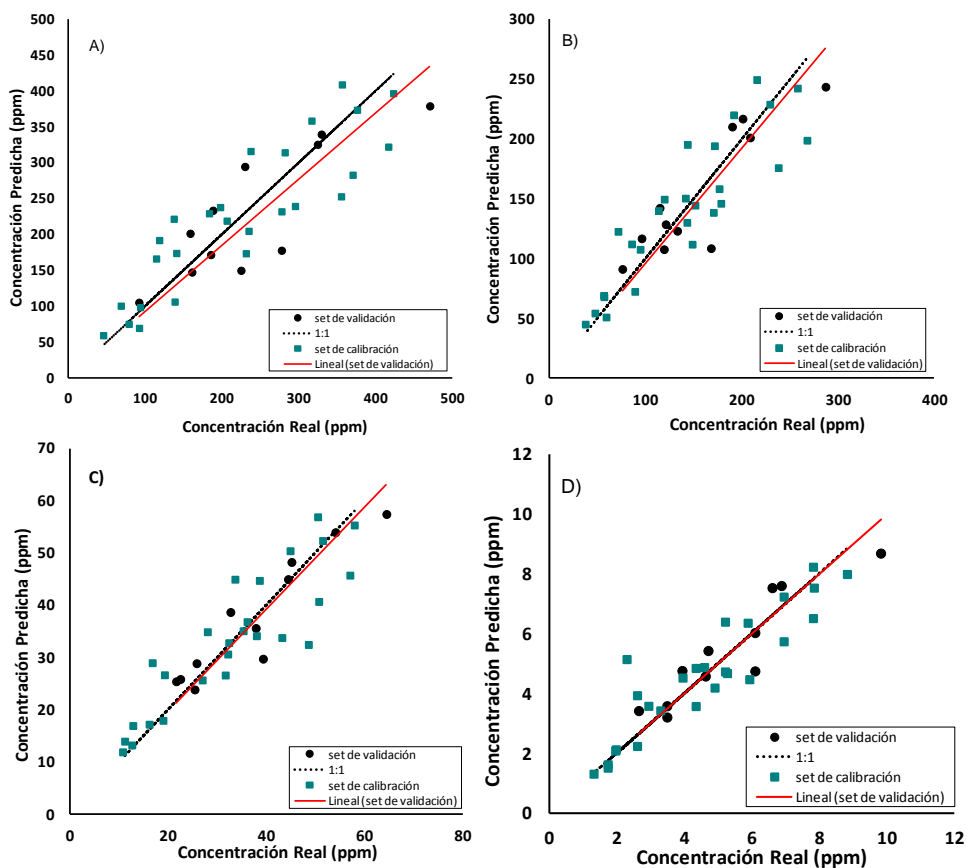


Figura 5.9. Resultados de la predicción de PLS1 en las 11 muestras de validación de efluentes de(A) DQO; (B) DBO (C)  $\text{NH}_4\text{-N}$ , (D)  $\text{PO}_4\text{-P}$ . La trama también muestra el modelo de 28 muestras del conjunto de entrenamiento.



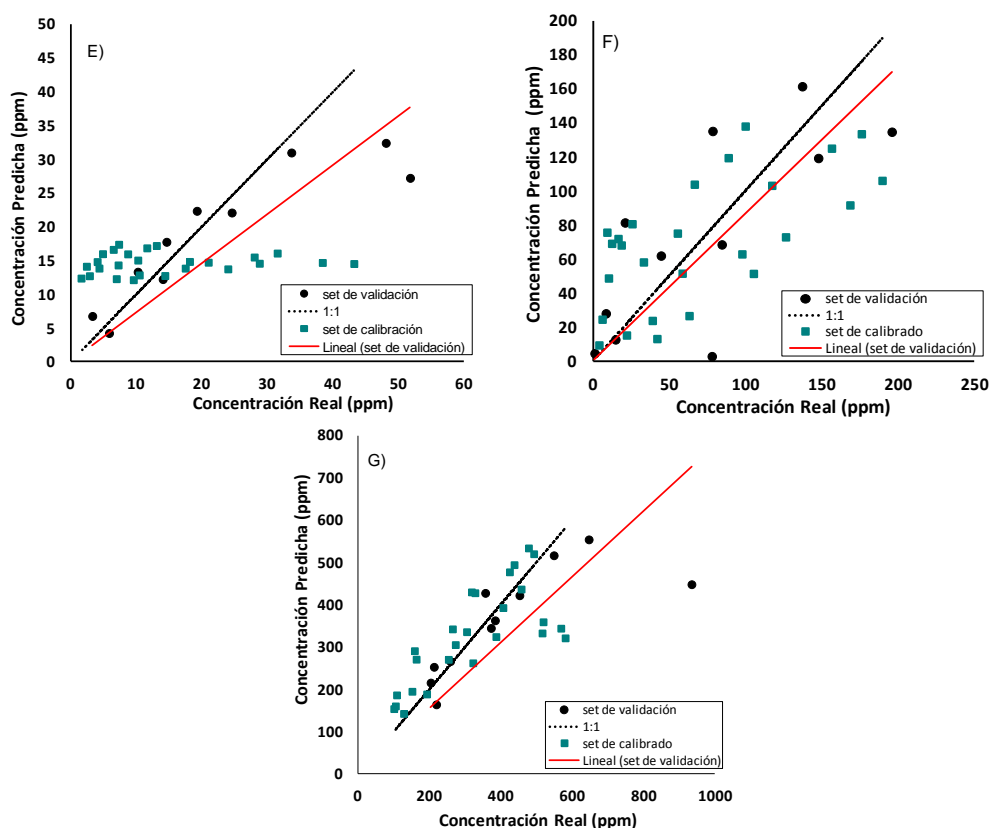


Figura 5.10. Resultados de la predicción de PLS1 en las 11 muestras de validación de efluentes de (E) SO<sub>4</sub>-S; (F) HAC; (G) Alk. La trama también muestra el modelo de 28 muestras del conjunto de entrenamiento.

Para las muestras de agua de los efluentes de aplicó un método similar de regresión PLS1 para la predicción de los parámetros de calidad del agua DBO, DQO, NH<sub>4</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, SO<sub>4</sub>-S, HAC y Alk. La Tabla 5.3 muestra los datos obtenidos al aplicar el método de PLS1 a los datos de validación de las aguas de salida. En este caso, se observó que el comportamiento predictivo se aleja más de la idealidad, obteniendo un modelo no tan bueno. Se están realizando más estudios para determinar las razones de este comportamiento inferior de predicción de la lengua en las aguas residuales, pero la causa más probable de este comportamiento es la presencia de compuestos derivados de azufre en forma de

sulfuros, que se obtienen debido a la naturaleza de las plantas de tratamiento anaeróbicas. De los resultados mostrados anteriormente, el resultado más notable es la posibilidad de utilizar una lengua electrónica simple para monitorizar la concentración de DBO, DQO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$  y Alk sin el empleo procedimientos de análisis tediosos y que consumen mucho tiempo. De los estudios electroquímicos, la alta correlación entre los datos de la lengua electrónica y la concentración de  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$  y Alk podría estar relacionado con la respuesta electroquímica del conjunto de electrodos a la presencia de estas especies. Además, se encontró una notable correlación entre la demanda química y la demanda biológica de oxígeno y los datos de la lengua voltamétrica muy probablemente debido a la oxidación parcial de los productos orgánicos cuando se aplica el set de pulsos a la lengua. Cabe destacar que los sistemas de lengua electrónica no son exigentes y que pueden ser fácilmente implementados en la monitorización continua de ciertos parámetros tales como DBO o DQO en EDARs. No obstante, hay que tener en cuenta que esta es una investigación preliminar que puede dar lugar a la aplicación de las lenguas electrónicas para la determinación semi-cuantitativa de determinados parámetros de calidad del agua en futuras implementaciones. Creemos que para determinadas aplicaciones, como por ejemplo, la calidad en la monitorización del agua de afluentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, los errores obtenidos en la detección de ciertos parámetros, tales como DBO, DQO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$  y Alk usando el método PLS1, podrían ser aceptables si se considera que las lenguas electrónicas permiten el análisis de las muestras en cuestión de segundos, tras un procedimiento sencillo y de bajo coste, por lo tanto reduciendo el tiempo de análisis de horas/días a minutos y, además, proporcionar una vigilancia continua in situ.

## 5.5. Conclusiones.

En este capítulo se ha propuesto un método para predecir los niveles de los parámetros más importantes en las plantas de tratamiento de aguas residuales, con base en el uso de una lengua electrónica voltamétrica que consiste en un conjunto de 8 electrodos metálicos (Au, Pt, Rh, Ir, Ag, Ni, Co y Cu) encapsulados en un cilindro de acero inoxidable.

Para cada parámetro de interés se ha seguido un procedimiento de entrenamiento y otro de validación usando un set de calibración formado por 28 muestras y otro de validación formado por 11.

Se han elaborado modelos de regresión PLS1 para los parámetros DBO, DQO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , HAC y Alk, en muestras de agua tanto del afluente y como del efluente. De los datos obtenidos en las muestras del afluente, se observó que la lengua electrónica mostró el poder de predicción relativamente bueno para la determinación de DBO, DQO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ , y Alk, mientras que la predicción de HAC fue significativamente peor. La lengua electrónica no es capaz de detectar la presencia de  $\text{SO}_4\text{-S}$  en las aguas de la salida. Cuando el modelo PLS1 se aplicó a las muestras del efluente, el modelo de predicción no fue tan bueno como el de las aguas del afluente.



## 5.6. Conclusions.

In this chapter a method to predict the levels of the most important parameters in wastewater treatment plants has been developed. The voltammetric electronic tongue consists of a set of 8 metallic electrodes (Au, Pt, Rh, Ir, Ag, Ni, Co and Cu) encapsulated in a stainless steel cylinder.

Using the electronic tongue, for each parameter of interest, we followed a training/validation procedure consisting in the use of a set of samples for training (28 samples) and a set for validation (11 samples).

The PLS1 regression method for the water quality parameters BOD, COD,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , HAC and Alk was applied for data elaboration in both influent and effluent water samples. From the data obtained in influent samples it was observed that the electronic tongue showed relatively good predictive power for the determination of BOD, COD,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ , and Alk, whereas the prediction HAC was significantly poorer. The electronic tongue is not capable of detecting the  $\text{SO}_4\text{-S}$  in the effluent water. When the PLS1 model was applied to the effluent samples the prediction model was not as good as for influent waters.



## **Capítulo 6:**

**Lengua electrónica para la  
monitorización de la maduración de la  
uva y el proceso de fermentación del  
mosto.**





## 6.1. Introducción.

En la producción de vino, la composición de la uva en el momento de la cosecha es un factor determinante de su calidad. Durante la maduración de la uva se producen varios procesos físico-químicos y bioquímicos encargados de que las uvas alcancen la calidad óptima para su transformación o consumo<sup>203,204</sup>. Todos los cambios que se producen durante este proceso tienen una evolución diferente con el tiempo, que está influenciada por factores genéticos, factores climáticos y geográficos y por las prácticas culturales<sup>205,206</sup>. Por estas razones, el proceso de maduración determinará la calidad de la uva, y el momento para la cosecha será un factor importante en la elaboración de vinos de calidad. Tradicionalmente, los indicadores de la fecha de cosecha se han determinado mediante parámetros tales como el peso de la baya y la densidad del mosto<sup>207</sup>, y de acuerdo con el contenido y la relación entre azúcares y acidez<sup>208</sup>, ya que durante la maduración de la uva se produce por un lado la acumulación de azúcares, agua y otras sustancias de reserva<sup>209</sup>, y por otro lado, la disminución de la acidez<sup>210,211</sup>. Hoy en

---

<sup>203</sup> M.L. González-Sanjosé, L.J.R. Barrón, B. Junquera, L.M. Robredo. Application of principal component analysis to ripening indices for wine grapes. *J. Food Compos. Anal.* (1991) 4, 245.

<sup>204</sup> J. Palacios, P. Cea, M. Cancer, L.M. Martínez, A. Avenzoza. Evolución de los índices de maduración y madurez en vid Rioja. *I.E.R.* 8. (1986)

<sup>205</sup> M.S. Andrades, M.L. González-Sanjosé. Influencia climática en la maduración de la uva de vinificación: estudio de cultivares de la Rioja y de Madrid. *Zubia monográfico* (1995) 7, 79.

<sup>206</sup> G.V. Jones, R.E. Davis. Climatic influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *Am. J. Enol. Vitic.* (2000) 51, 249.

<sup>207</sup> B.G. Coombe. Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *Am. J. Enol. Vitic.* (1987) 38, 120.

<sup>208</sup> B. Junquera, L.M. Robredo, C. Díez. Influencia de la procedencia geográfica y varietal en el comportamiento de ácidos y azúcares de la uva a lo largo de la maduración. *Anales de Edafología y Agrobiología* (1988) 47, 1619–1634.

<sup>209</sup> E. Peynaud. *Enología Practica*. (1989) In Mundo-Prensa. (Ed.) Madrid, España.

día, la Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) se está convirtiendo en una técnica analítica más atractiva para supervisar este proceso debido a que es una técnica no invasiva. En la bibliografía, podemos encontrar una gran cantidad de trabajos que muestran que esta técnica puede ser utilizada para la caracterización cuantitativa de parámetros tales como el contenido de azúcar<sup>212</sup>, pH<sup>213</sup> y acidez<sup>214</sup>.

La fermentación del vino tiene dos etapas bien diferenciadas: primaria y secundaria; también a veces descritos como fermentaciones aeróbicas y anaeróbicas. La fermentación primaria tiene lugar típicamente durante los primeros tres a cinco días. En promedio, el 70 por ciento de la actividad de fermentación se produce durante estos primeros días. Y en la mayoría de los casos, se forma de espuma durante este tiempo de fermentación rápida.

La fermentación primaria se llama también una fermentación aeróbica porque el recipiente de fermentación está abierto al aire. Este aire desempeña un papel importante en la multiplicación de las células de levadura. Esto es lo importante porque sin aire esta etapa se ve obstaculizada. Por eso es importante que no se utilice un cierre de aire durante los primeros días de fermentación. Una parte

---

<sup>210</sup> R.C. King, C.A. Sims, L.F. Moore, R.P. Bates. Effects of maturity, skins contact and carbonation on the quality of sterilefiltered with Muscadine grape juice. *J. Food Sci.* (1988) 53, 1474.

<sup>211</sup> L.M. Robredo, B. Junquera, M.L. González-Sanjosé, L.J. Barroón. Biochemical events during ripening of grape berries. *Ital. J. Food Sci.* (1991) 3, 173.

<sup>212</sup> J. Fernández-Novales, M.I. López, M.T. Sánchez, J. Morales, V. González Caballero. Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking and aging of white and red wines. *Food Res. Int.* (2009) 42, 285.

<sup>213</sup> M. Larraín, A.R. Guesalaga, E. Agosin. A multipurpose portable instrument for determining ripeness in wine grapes using NIR spectroscopy. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* (2008) 57, 294.

<sup>214</sup> F. Chauchard, R. Codgill, S. Roussel, J.M. Roger, V. Bellon-Meurel. Application of LS-SVM to non-linear phenomena in NIR spectroscopy: development of a robust and portable sensor for acidity prediction in grapes. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* (2004) 71, 141–150.

importante de la energía de la levadura se está dedicando a reproducirse a sí misma. La fermentación secundaria es cuando se producirá el 30% restante de la actividad de fermentación. A diferencia de los típicos cuatro a siete días la fermentación primaria se lleva a la segunda fermentación suele durar de una a dos semanas, dependiendo de la cantidad de nutrientes y azúcares todavía disponibles. La fermentación secundaria es mucho más lenta, con menos actividad en cualquier momento dado.

En este capítulo se ha utilizado la lengua electrónica descrita a lo largo de todo el trabajo para caracterizar el proceso de maduración de 7 variedades de uva y el proceso posterior de fermentación de un tipo concreto, la uva Macabeo. Mediante el uso de análisis de PCA se lleva a cabo una clasificación de dichas variedades y mediante análisis de PLS1 se correlacionó la respuesta obtenida con 4 parámetros que caracterizan la maduración de la uva, como son la Acidez Total, pH, ° Brix y Alcohol Aparente. Por otra parte, la monitorización de la fermentación se llevó a cabo mediante análisis PCA y se confirmó utilizando análisis de PLS1 que correlacionan los valores de densidad y las medidas electroquímicas.

## **6.2. Experimental.**

### **6.2.1. Preparación de muestras.**

Para estudiar el proceso de maduración de la uva, se analizaron siete variedades de uva (Macabeo, Chardonnay, Pinot Noir, Caberné Sauvignon, Shyrah, Merlot y Bobal) durante un mes, con una frecuencia de muestreo de dos días, dando lugar a un número de días muestreados de 12 y a un total de 68 muestras (menos de 84 porque algunas variedades se recolectaron antes de terminar los estudios). Una vez recogidas y trituradas, y después de esperar durante 5 min, las muestras se decantaron para separar el jugo de la pulpa.

Para el seguimiento de fermentación sólo se midió el mosto de una sola variedad de uva, concretamente, el mosto de la variedad Macabeo. El seguimiento de la fermentación se realizó durante 10 días consecutivos, que comienzan con la adición por parte de la enóloga de las levaduras al vino. Una vez incubadas las levaduras, cada día se tomaron tres muestras que contenían 30 ml de zumo del tanque.

### **6.2.2. Caracterización Fisicoquímica de las muestras.**

Con el objetivo de controlar el grado de la madurez de la uva, se caracterizaron 4 parámetros fisicoquímicos indicativos del grado de maduración que las uvas han alcanzado. Los parámetros químicos medidos fueron: acidez total (AT), pH, contenido de azúcar ( $^{\circ}$  Brix) y alcohol aparente (AP). La acidez total se determinó por titulación con NaOH 0.5 N utilizando un pHmetro Crison que tiene incorporada una bomba semiautomática. Con este equipo también se determinó el pH. El contenido de azúcar fue determinado usando un refractómetro enológico y el alcohol aparente se calculó usando la siguiente ecuación:  $\% \text{ vol} = (0.675 * ^{\circ} \text{Brix}) - 2.0839$ . La densidad se determinó usando un densímetro de vidrio.

### **6.2.3. La lengua electrónica.**

El sistema de medida utilizado para este trabajo ha sido el mismo que se ha empleado en los Capítulos 4 y 5 de esta tesis. El dispositivo de lengua electrónica al igual que en capítulos anteriores, se compone por 8 electrodos de trabajo (Pt, Rh, Ir, Au, Co, Cu, Ag y Ni) encapsulados de 4 en 4 en dos cilindros de acero inoxidable, con una diferencia; el diámetro de los metales se ha incrementado hasta 2 mm de diámetro. Este aumento de superficie proporciona una mayor intensidad de corriente en la respuesta del dispositivo. En todos los casos la

superficie de las lenguas se preparó mediante un pulido manual, para proporcionar una superficie especular y sin rayas. Este protocolo de limpieza y acondicionamiento ha sido explicado con más detalles en la parte experimental de capítulos anteriores.

### 6.2.3.1. Procedimiento de medida.

Todas la muestras utilizadas, tanto las referentes al proceso de maduración, como las empleadas en el estudio de la fermentación de la uva, fueron termostatzadas a 25 ° C y medidas con el equipo segundo equipo electrónico desarrollado en el IDM<sup>215</sup>.

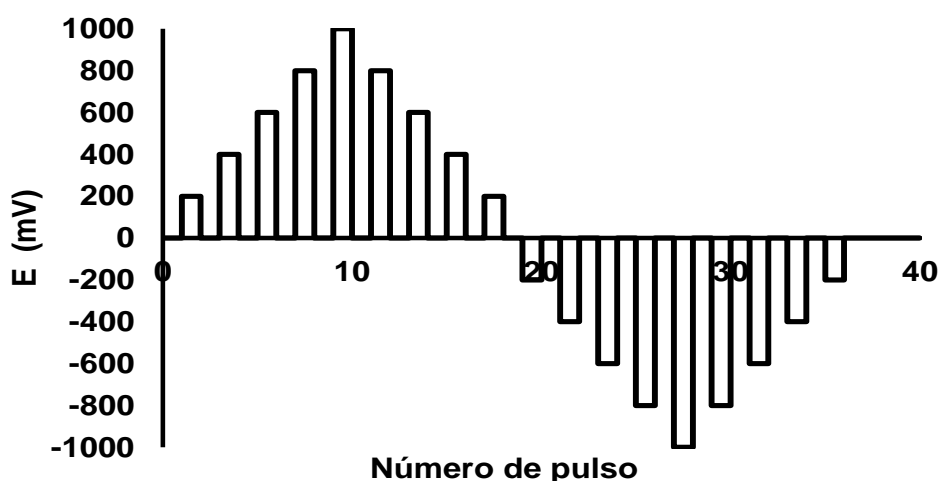


Figura 6.1. Secuencia de pulsos aplicada a una muestra Macabeo.

En este estudio se aplicó un tren de pulsos que se puede incluir dentro de los pulsos de voltametría de gran amplitud (LAPV) y que ha sido ampliamente utilizado

<sup>215</sup> M. Alcañiz. Tesis doctoral: Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el ámbito agroalimentaria. UPV (2011).

y que proporciona buenos resultados<sup>216,217</sup>. La figura 6.1 muestra el patrón de pulsos aplicado que consta de 40 pulsos en una configuración similar a una voltametría escalera, pero con un salto adicional en el que el potencial vuelve a ser 0 después de cada incremento, con una duración de 50 ms. En particular, la secuencia de pulsos fue: 0, 200, 0, 400, 0, 600, 0, 800, 0, 1000, 0, 800, 0, 600, 0, 400, 0, 200, 0, -200, 0, -400, 0, -600, 0, -800, 0, -1000, 0, -800, 0, -600, 0, -400, 0, -200, 0, 0, 0, 0 (mV).

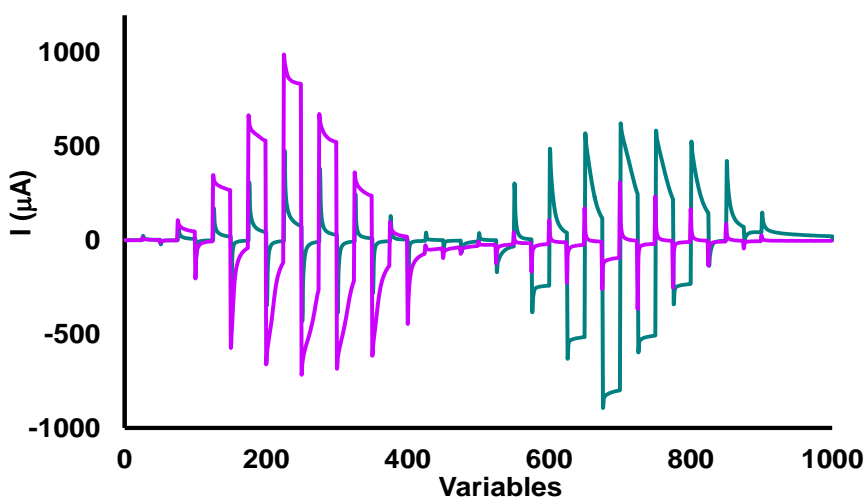


Figura 6.2. Respuesta obtenida para una muestra Macabeo utilizando los electrodos de Pt (línea verde) y Ag (línea morada).

El incremento en el potencial de los pulsos fue de 200 mV, y los valores de potencial máximos y mínimos se eligieron con el fin de evitar fenómenos de electrólisis del agua. Un total de 8000 valores de intensidad de corriente (25

<sup>216</sup> F. Winqvist, I. Lundström, P. Wide. The combination of an electronic tongue and an electronic nose. *Sens. Actuators B: Chem.* (1999) 58, 512–517.

<sup>217</sup> A. Gútes, F. Cespedes, M. del Valle, D. Louthander, C. Krantz-Rülcker, F. Winqvist. A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters. *Sens. Actuators B: Chem.* (2006) 115, 390-395.

puntos para el pulso x 40 impulsos x 8 electrodos) se registraron para cada muestra. El tiempo requerido para completar la medida con cinco iteraciones fue de sólo dos segundos. La etapa limitante de velocidad para la adquisición de datos es realmente el pulido mecánico de electrodos electroquímicos que requiere unos 5 minutos. La Figura 6.2 ilustra la corriente medida para una muestra Macabeo cuando se utiliza un electrodo de Pt (línea verde) y uno de Ag (línea morada). Los electrodos nobles restantes (Rh, Ir y Au) tienen el mismo comportamiento que el electrodo de platino y los restantes no nobles siguen el comportamiento del electrodo de plata. Ambos grupos de electrodos (nobles y no nobles) proporcionan una corriente de respuesta opuesta.

Para el estudio de la maduración de la uva se midieron 68 muestras, mientras que para el seguimiento de la evolución de la fermentación se usaron 33 muestras. Tanto las muestras empleadas para la maduración de las uvas, como las muestras procedentes del proceso de fermentación, fueron divididas aleatoriamente en dos grupos: el set de calibración y el de validación. Cada muestra se midió cinco veces y en una etapa de pre-procesamiento se realizó la media de las mismas. El valor típico de la desviación típica en una muestra por lo general no excede el valor de  $0.5 \mu\text{A}$  para los electrodos nobles, aunque fue algo mayor para los electrodos de cobalto y níquel. Cuando la desviación estándar fue mayor que 0.5, la serie de datos fueron eliminados y remplazados por una nueva repetición de recogida de datos.

## 6.3. Resultados.

### 6.3.1. Maduración de la uva.

#### *6.3.1.1. Diferenciación entre distintas variedades de uva.*

Uno de los objetivos de este trabajo fue utilizar la lengua electrónica para clasificar las diferentes variedades de uva estudiadas en este trabajo. Para ello, la respuesta de la lengua electrónica fue analizada empleando la técnica de PCA. Como hemos dicho anteriormente, esta técnica descompone la matriz de datos primarios estableciendo una nueva base de coordenadas, formada por direcciones ortogonales con una variación máxima de datos. La representación en 2D de los vectores propios de la nueva base de coordenadas muestra la posibilidad de discriminar entre las diferentes variedades medidos. Análisis de PCA se llevaron a cabo en tres momentos diferentes, al principio, en medio y al final (días: 1, 13 y 23) del proceso de maduración de las uvas. Para cada día, se crearon tres modelos de PCA utilizando la información del conjunto de los 8 electrodos, utilizando la información de electrodos nobles (Pt, Rh, Ir y Au) y mediante el uso de los electrodos no nobles (Cu, Co, Ag y Ni).



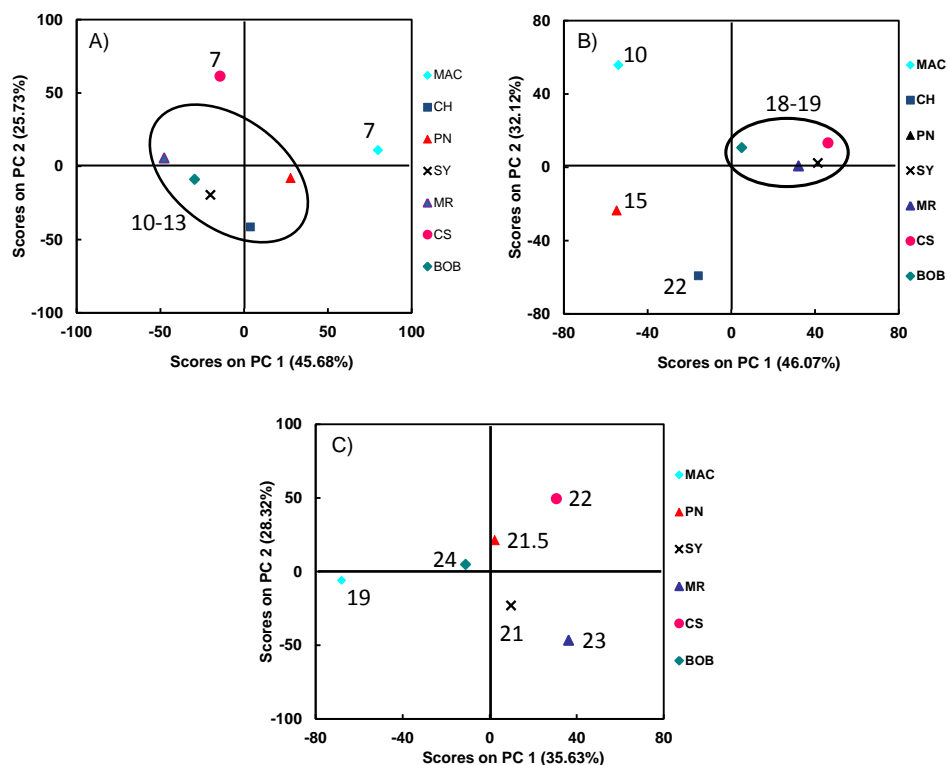


Figura 6.3. Gráficas de scores de PCA creadas para la maduración de las uvas durante 3 tres días diferente: A) día 1, B) día 13 y C) días 23; utilizando los electrodos de Pt, Rh, Ir y Au. Las muestras aparecen agrupada en de acuerdo con su valor de ° Brix.

La Figura 6.3 muestra la gráfica de scores de PCA obtenidos, para los días 1, 13 y 23, al principio, en mitad y al final del proceso de maduración; cuando se utilizan los electrodos nobles. El PC1 contiene sólo el 47.94%, 49.93% y 38.13% de la varianza, y los dos primeros componentes representados 73.92%, 75.27% y 64.49% de la varianza total, respectivamente, mientras que fueron necesarios 6 PCs para representar el 95% de la varianza. En el gráfico que representa los datos del primer día podemos ver una agrupación que contiene 5 variedades de uva de la total y dos muestras que quedan fuera de la misma. En la mitad del proceso (día 13) del grupo se forma solamente por 4 variedades y una más está fuera y al final

del proceso de maduración de cada variedad aparece en un lugar diferente de la gráfica. El número que aparece al lado de cada muestra es el valor de ° Brix. Si tratamos de correlacionar este parámetro fisicoquímico con los grupos realizados, podemos ver que las muestras agrupadas en cada “cluster” tienen el mismo valor, y las muestras restantes tienen un valor diferente. El análisis PCA no es capaz de discriminar entre las diferentes variedades de uva, pero nos proporciona un modelo que muestra cómo evoluciona cada variedad.

#### *6.3.1.2. Modelos de PLS para cuantificar el grado de madurez de las uvas.*

El análisis mediante Mínimos Cuadrados Parciales (PLS1) fue utilizado para obtener una correlación entre las medidas voltamétricas utilizando la lengua electrónica y los parámetros fisicoquímicos (Acidez Total, pH, ° Brix y Alcohol Aparente), que se obtuvieron mediante métodos analíticos convencionales.

El número de variables latentes en PLS1 es un parámetro del procedimiento cuyo valor se estima a partir de los datos de calibración. El número de variables latentes se calculó mediante estudios de la validación cruzada empleando el método de “leave-one-out”. Un total de 46 y 22 muestras fueron utilizadas en las etapas de calibración y de validación, respectivamente. Por otra parte, se crearon 3 modelos de PLS1 diferentes para cada parámetro acidez total, pH, ° Brix y alcohol aparente. El primero de ellos utiliza la información electroquímica del conjunto de 8 electrodos, el segundo, emplea la información de los electrodos nobles (Pt, Rh, Ir y Au) y el tercero se calcula a partir de los electrodos no nobles (Cu, Co, Ag y Ni). La Figura 6.4 muestra los resultados de la aplicación del modelo PLS1 para el conjunto de validación a los parámetros de madurez de la uva utilizando los electrodos nobles. Además en la Tabla 1 se muestran los parámetros de ajuste ( $r^2$ ,  $p_1$ ,  $p_2$ , RMSEC, RMSECV y RMSEP) del modelo de predicción PLS1

aplicado al conjunto de validación para los tres tipos diferentes de modelos creados.

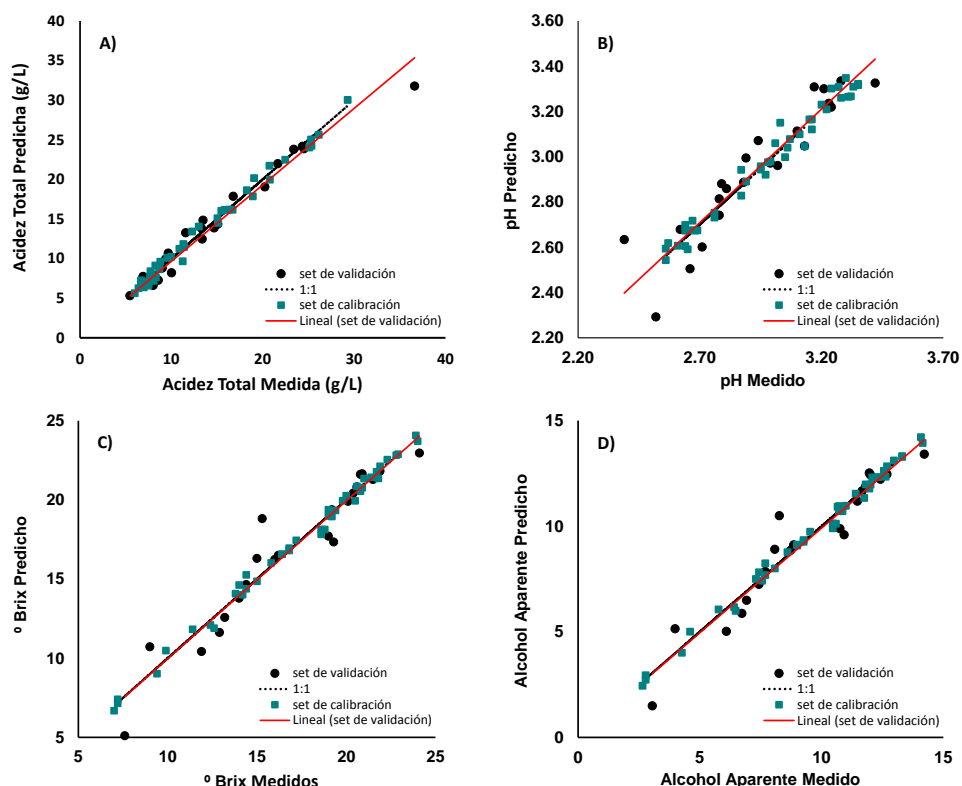


Figura 6.4. Resultados de los modelos de predicción de PLS1 de las 22 muestras de validación para (A) Acidez total, (B) pH, (C) ° Brix y (D) Alcohol aparente. La gráfica también muestra las 46 muestras del modelo de entrenamiento.

Mediante una simple inspección visual de la Figura 6.4, se obtiene una buena idea de la exactitud y precisión obtenida con el modelo de predicción que se aplica al conjunto de validación usando la información de electrodos nobles. Además, un análisis más riguroso se consigue mediante un ajuste lineal de los puntos experimentales. Hemos utilizado un modelo lineal simple (es decir,  $y = p_1 \cdot x + p_2$ )

para ajustar las previsiones frente a la concentración real y se han obtenido los parámetros  $p_1$  (pendiente de la línea de montaje),  $p_2$  (intersección con el eje y) y RMSEP (media cuadrática de predicción). Parámetro  $p_1$  y  $p_2$  están relacionados con la exactitud en la predicción, mientras que RMSEP con la precisión del modelo. Así un modelo PLS1 es mucho mejor cuanto más próximo a 1 sea el valor  $p_1$  y a 0 el valor de RMSEP. De un simple examen a la Tabla 6.1 y a las Figuras 6.4 se evidencia que la lengua electrónica muestra un poder predictivo relativamente bueno para la determinación de la acidez total, pH, ° Brix y alcohol aparente. Por ejemplo, se observaron valores de  $r^2$  para el conjunto de validación mayores que 0.9 para los parámetros de acidez total, ° Brix y Alcohol aparente. Además, en todos estos casos los valores de  $p_1$  son cercanos a 1, lo que indica un alto grado de exactitud en la predicción.

Tabla 6.1. Parámetros de ajuste ( $r^2$ ,  $p_1$ ,  $p_2$ , RMSEC, RMSECV y RMSEP) de los modelos de predicción PLS1 para los niveles de Acidez Total, pH, ° Brix y Alcohol Aparente en las muestras de validación.

		$r^2$	$p_1$	$p_2$	RMSEC	RMSECV	RMSEP
8 electrodos	Acidez Total	0.956	0.947	0.486	1.45	1.83	1.67
	pH	0.857	0.929	0.217	0.07	0.11	0.09
	° Brix	0.903	1.069	-1.401	0.28	1.56	1.55
	Alcohol aparente	0.903	1.06	-0.753	0.20	1.02	1.03
Nobles	Acidez Total	0.969	0.919	0.855	0.94	1.69	1.41
	pH	0.863	0.995	0.023	0.03	0.07	0.09
	° Brix	0.921	1.014	-0.321	0.39	1.30	1.28
	Alcohol aparente	0.923	1.002	-0.115	0.27	0.89	0.84
No nobles	Acidez Total	0.952	0.901	-1.443	0.49	1.72	1.68
	pH	0.843	0.921	0.232	0.10	0.13	0.09
	° Brix	0.75	0.979	-0.062	1.66	2.08	2.46
	Alcohol aparente	0.746	0.973	-0.05	1.24	1.41	1.66

La Tabla 6.1 muestra los parámetros de ajuste para todos los modelos creados por PLS1. Estos parámetros son en todos los casos cercanos a 1 para  $r^2$  y  $p1$ , y a 0 para  $p2$ , por lo que todos los modelos se pueden utilizar en el control de la madurez de la uva, pero los modelos creados con electrodos nobles son ligeramente mejores.

### **6.3.2. Proceso de Fermentación.**

Para los estudios de fermentación sólo se empleó una variedad de uva, concretamente la uva Macabeo. Cuando esta variedad tenía aproximadamente unos 22 ° Brix, se cosechó, se trituró y se almacenó en un tanque. El proceso de fermentación fue iniciado por parte de la enóloga mediante la adición de las levaduras del vino. Cada día se tomaron tres muestras del tanque que se midieron con la lengua electrónica y que se caracterizaron físico-químicamente mediante el valor de la densidad. Esta supervisión se llevó a cabo a lo largo de 10 días consecutivos.

#### *6.3.2.1. Monitorización en un mapa.*

Una vez que el zumo de uva fue medido con la lengua electrónica, la información de corriente obtenida, se analizó por PCA. El objetivo de esta parte fue seguir la evolución de la fermentación en un mapa. Para ello y al igual que en los estudios anteriores se realizaron análisis de PCA para cada muestra de tres formas diferentes: utilizando el conjunto de electrodos 8, utilizando los electrodos nobles y mediante el uso de los electrodos no nobles.

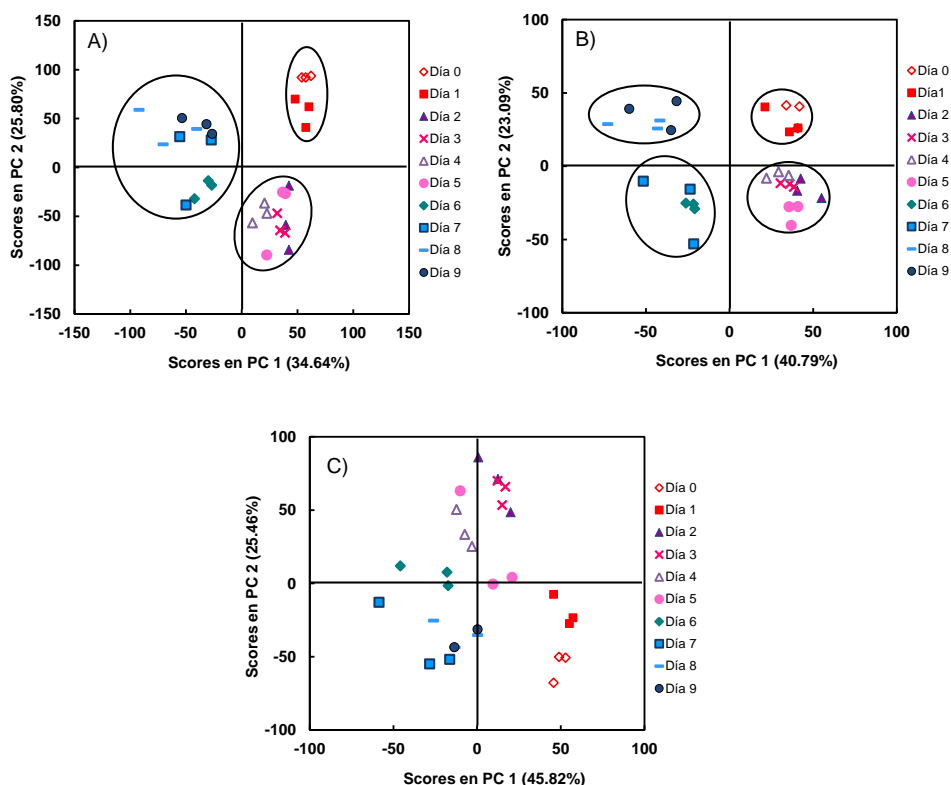


Figura 6.5. Gráficas de scores de PCA creadas para la fermentación del mosto usando A) el conjunto de 8 electrodos; B) los metales nobles (Pt, Rh, Ir y Au) y C) los metales no nobles (Co, Cu, Ag y Ni).

Se analizaron un total de 30 muestras (3 muestras por día x 10 días). La Figura 6.5 A) muestra la gráfica de scores de PCA realiza para los electrodos nobles; la Figura 6.5B) el modelo realizado por el conjunto de electrodos y la C), utilizando electrodos no nobles. El primer PC contiene un 34.64%, 40.70% y 45.82%, respectivamente, de la varianza de los datos, mientras que los dos primeros componentes representados suman un 60.44%, 63.79% y 71.28%, respectivamente, de la varianza total. Para alcanzar un 99.55% de la varianza total, son necesarios seis, siete y siete, respectivamente. La gráfica de scores de PCA obtenidos para el conjunto de electrodos muestra tres grupos bien

diferenciados. El primer grupo, que aparece en la gráfica en la parte superior derecha, contiene las muestras de los días 0 (antes de la adición de la levadura) y 1. El segundo grupo está formado por los días de 2 a 5 (aparece en el cuadrante inferior derecha), y el último tiene la información de los días entre 6 y 9. Siguiendo esta tendencia, la Figura 6.4b) muestra un comportamiento similar pero con la salvedad de que el clúster no aparece tan bien definido. Por último, en la última gráfica de scores de PCA, Figura 6.4c), podemos ver una tendencia de los datos, pero no se puede formar ningún grupo debido a las muestras no presentan una buena reproducibilidad y si una elevada dispersión en el mapa.

#### *6.3.2.1. Estudios de PLS.*

Un total de 30 muestras fueron usadas para crear los modelos de PLS1 para correlacionar el valor de la densidad con los datos electroquímicos. La densidad del vino cambia a lo largo de la fermentación, ya que la densidad del alcohol generado es menor que la densidad del agua, por lo que el valor de esta disminuye a lo largo del proceso de fermentación. Este cambio en la densidad de a mezcla proporciona de manera aproximada el grado alcohólico de la misma. Las muestras se dividieron en dos grupos, uno formado por 20 muestras utilizadas en la calibración del modelo, y 10 para formar el conjunto de validación. El número de variables latentes necesarias se calculó mediante un análisis de validación cruzada. Tres modelos PLS1 se realizaron con: a) el conjunto de información electroquímico (8 electrodos), b) los electrodos nobles y c) que los electrodos no nobles.

Tabla 6.2. Parámetros de ajuste ( $r^2$ ,  $p_1$ ,  $p_2$ , RMSEC, RMSECV y RMSEP) de los modelos de predicción PLS1 para los niveles de Acidez Total, pH, °Brix y Alcohol Aparente en las muestras de validación.

	$r^2$	$p_1$	$p_2$	RMSEC	RMSECV	RMSEP
8 electrodos	0.878	0.904	102.36	1.38	13.27	10.73
Nobles	0.895	0.883	125.06	0.70	14.07	10.71
No nobles	0.883	0.802	200.15	5.29	10.23	10.85

La Tabla 6.2 muestra los parámetros de ajuste obtenidos para los 3 modelos PLS1. En todos los casos los modelos obtenidos tienen un valor de  $r^2$  superior a 0.8, mientras que el valor de  $p_1$  es 0.904, cuando se emplea el conjunto de 8 electrodos. Todo esto podría ser utilizado para monitorear el proceso de fermentación, pero parece que el mejor modelo es lograr utilizando la información de todos los electrodos. La Figura 6.6 muestra el modelo de PLS1 obtenido usando la información de los 8 electrodos.

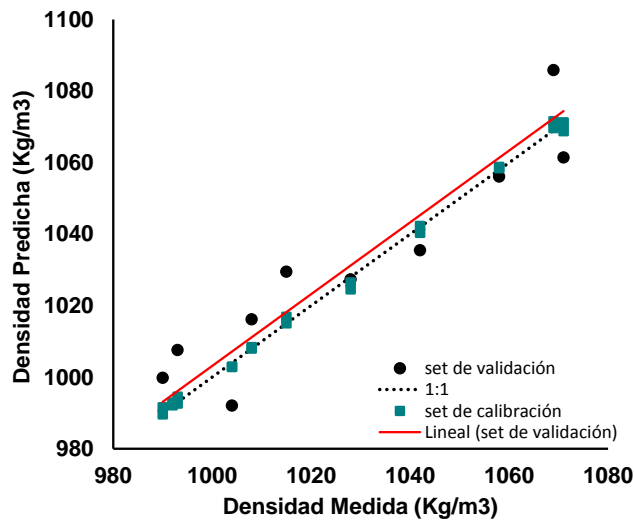


Figura 6.6. Los resultados de predicción de PLS1 en las 10 muestras de validación de la densidad. El diagrama muestra también las 20 muestras del modelo del conjunto de entrenamiento usando el conjunto de electrodos 8.



## 6.4. Conclusiones.

En este trabajo se propone una lengua electrónica voltamétrica para el control de la maduración de las uvas y al seguimiento de la fermentación de zumo de uva. La lengua electrónica consiste en un conjunto de 8 electrodos metálicos (Pt, Rh, Ir, Au, Co, Cu, Ag y Ni) encapsulado de 4 en 4 en dos cilindros de acero inoxidable.

Los análisis de PCA llevados a cabo sobre 7 de las más comunes variedades de uva recogidas a lo largo de un mes, no permiten diferenciar entre ellas, pero las gráficas de scores de PCA obtenidas si muestran la presencia de clústeres que se pueden correlacionar con los parámetros fisicoquímicos medidos, como los ° Brix. Los análisis de PLS1 fueron creados usando un total de 46 y 22 muestras como set de calibración y validación, respectivamente. Los modelos PLS1 creados para la acidez total, pH, ° Brix y Alcohol aparente tenía una buena exactitud y precisión en las muestras de predicción.

Para la supervisión del proceso de fermentación, los análisis de PCA se calcularon para las medidas obtenidas a lo largo de 10 días consecutivos. Estos análisis ofrecen un mapa con 3/4 grupos que muestran la evolución a lo largo del tiempo de la fermentación. Un seguimiento más exhaustivo fue desarrollado utilizando los análisis de PLS1. La densidad de las muestras correlaciona con una buena exactitud y precisión con las medidas obtenidas a partir de la lengua electrónica.



## 6.5. Conclusions.

In this work, we report a voltammetric electronic tongue to monitor the ripeness of grapes and to monitor the grape-juice fermentation process. The electronic tongue consisted of a set of 8 metallic electrodes (Pt, Rh, Ir, Au, Co, Cu, Ag and Ni) that were housed inside a stainless steel cylinder.

For the ripeness of grapes studies, PCA analysis applied to the electrochemical measurements are not able to classify between the most common varieties of grapes, but this analysis provide a score plot which clustering correlates the ripeness state of each variety of grape. PLS1 analysis were applied using a total of 46 and 22 samples were used in the training and the validation steps, respectively. The PLS1 models created for Total Acidity, pH, °Brix and Apparent Alcohol had a good accuracy and precision in the prediction samples.

For the monitoring of fermentation process, PCA analyses were calculated for the measurements obtained along 10 consecutive days. These analyses offer a map with 3 clusters that show the evolution along the time of the fermentation. More exhaustive monitoring was developed using PLS1 analysis. The density of the samples was correlated with a good accuracy and precision using this tool.



## **CONCLUSIONES GENERALES**



- Se ha descrito una lengua electrónica voltamétrica compuesta 8 metales, que se pueden agrupar de 4 en 4 dependiendo de la reactividad que presentan cada uno de ellos. El primer grupo está compuesto por cuatro metales nobles (Pt, Rh, Ir y Au) y el segundo de ellos (Cu, Co, Ag y Ni). Se ha demostrado que cada grupo de metales presenta una reactividad muy diferenciada frente a un determinado compuesto.
- Se ha demostrado a lo largo de los capítulos la importancia que tiene realizar un diseño de pulsos adecuado en los resultados finales, optimizando tanto la forma de la onda aplicada, como el tiempo de aplicación del pulso.
- Se ha verificado la capacidad de la lengua electrónica para discriminar entre simulantes de gases nerviosos DCP y DCNP y un conjunto de organofosforados que posee una estructura similar a los compuestos de interés, pero una menor reactividad. Además, se diseñó un diseño experimental que permitió la determinación simultánea de ambos simulantes en presencia de un interferente como el OP-2.
- Se ha desarrollado una aplicación para dicha lengua electrónica capaz de determinar agentes de salado en muestras de carne picada. Se han determinado con buena exactitud tres niveles de concentraciones de tres sales utilizadas en procesos de salado como son el NaCl, el NaNO<sub>2</sub> y el NaNO<sub>3</sub>. Dichos compuestos se determinaron en agua y en carne picada, demostrando la viabilidad de análisis del contenido salino en una muestra de naturaleza semisólida, obteniéndose resultados satisfactorios en los análisis de cloruro de sodio, y moderados en el caso del nitrato y nitrito de sodio.

- Se ha estudiado la viabilidad de la aplicación de la lengua electrónica para el control de la calidad de las aguas residuales, siguiendo la evolución de los parámetros. Se han elaborado modelos de regresión PLS1 para los parámetros DBO, DQO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , HAC y Alk, en muestras de agua tanto del afluente y como del efluente. De los datos obtenidos en las muestras del afluente, se observó que la lengua electrónica mostró el poder de predicción relativamente bueno para la determinación de DBO, DQO,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ , y Alk, mientras que la predicción de  $\text{SO}_4\text{-S}$  y HAC fue significativamente peor. Cuando el modelo PLS1 se aplicó a las muestras del efluente, el modelo de predicción no fue tan bueno como el de las aguas del afluente.
- Se ha desarrollado una lengua electrónica de mayor superficie aplicada a al control de la evolución de la maduración de las uvas y del proceso de fermentación para la obtención del cava. Los análisis de PCA llevados a cabo sobre 7 variedades de uva ofrecen una agrupación de las mismas en función de su madurez. Además, se demostró la capacidad de la lengua para la determinación de los parámetros acidez total, pH, ° Brix y Alcohol con buen exactitud y precisión. Para la supervisión del proceso de fermentación, los análisis de PCA ofrecen un mapa con 3/4 grupos que muestran la evolución a lo largo del tiempo de la fermentación. Un seguimiento más exhaustivo fue desarrollado utilizando los análisis de PLS1. La densidad de las muestras correlaciona con una buena exactitud y precisión con las medidas obtenidas a partir de la lengua electrónica.



## **GENERAL CONCLUSIONS**



- It has been described a voltammetric electronic tongue based on 8 metals that can be classified into 2 groups depending on their reactivity. The first group comprises four noble metals (Pt, Rh, Ir and Au) and the second four non-noble metals (Cu, Co, Ag and Ni). It has been shown that each group of metals has a very different reactivity against a particular compound.
- It is shown along the chapters the importance of proper pulse design in the final results, thus optimizing the pulse arrays applied, and the pulse application time.
- It has been verified the capability of an electronic tongue to discriminate between the nerve agents mimics DCP and DCNP and a set of organophosphorus which have a similar structure to the compounds of interest, but lower reactivity. Furthermore, an experimental design which permitted the simultaneous determination of both mimics in the presence of an interferent such as the OP-2.
- It has been developed an application for this electronic tongue capable of determining salted agents in beef samples, were determined with good accuracy three concentration levels of the three used salts in this process such as NaCl, NaNO<sub>3</sub> and NaNO<sub>2</sub>. These compounds were determined in water and minced meat, demonstrating the feasibility of analysis of salt content in a sample of semi-solid nature, and obtaining satisfactory results in the analysis of sodium chloride, and moderate in the case of sodium nitrate and nitrite.
- The feasibility of the application of the electronic tongue to control the quality of wastewater has been studied; following the evolution of the parameters PLS1 regression models have been developed for parameters

BOD, COD,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{SO}_4\text{-S}$ , and Alk HAC in water samples as both the influent and effluent samples. From the data obtained in the influent samples, it was observed that the electronic tongue showed relatively good predictive power for determination of BOD, COD,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ , and Alk, while the prediction of  $\text{SO}_4\text{-S}$  and HAC was significantly worse. When the PLS1 model was applied to the effluent samples the prediction model was not as good as the influent water.

- It has been developed an electronic tongue with larger surfaces applied to control the evolution of the maturation of grapes and the fermentation process for obtaining cava. The PCA analysis calculated for 7 grape varieties offer the same group based on their maturity. Furthermore, it has been demonstrated the ability of the electronic tongue to determinate parameters such as total acidity, pH, ° Brix and apparent alcohol with good accuracy and precision. For monitoring the fermentation process, the PCA analysis provides a map with 3 or 4 groups that show the evolution over time of fermentation. PLS1 analysis correlates the density measurements obtained from the electronic tongue with good accuracy and precision.